

**Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. Pohlemann)**

**Immobilisierung von Transforming Growth Factor β_1
an verschiedene Oberflächen und Bestimmung des
differenzierenden Effekts auf Fibroblasten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2010**

vorgelegt von:
Nadine Simone Murawski geb. Grenner
geb. am: 12.10.1980
in Ottweiler

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.1.	Zusammenfassung	IV
1.2.	Summary	VI
2.	Einleitung	1
2.1.	Übersicht	1
2.2.	Wundheilung	2
2.2.1.	Myofibroblasten in der Wundheilung	4
2.2.2.	Myofibroblasten bei Fibrose und Tumor	5
2.3.	TGF- β_1	6
2.4.	Tissue Engineering	8
2.5.	Strategien für die Proteinimmobilisierung an Oberflächen	9
2.6.	Ziele und Fragestellung	11
2.6.1.	Differenzierung	11
2.6.2.	Immobilisierung	11
3.	Material und Methoden	13
3.1.	Material	13
3.1.1.	Geräte	13
3.1.2.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	14
3.2.	Methoden	16
3.2.1.	Sterilisation von Materialien und Lösungen	16
3.2.2.	Zellkultur	16
3.2.2.1.	Expansion	16
3.2.2.2.	Passagierung	17
3.2.2.3.	Mediumwechsel	17
3.2.2.4.	Vorbereitung von Glasobjektträgern	17
3.2.2.5.	Kryokonservierung von Zellen	18
3.2.2.6.	Kultivierung kryokonservierter Zellen	18
3.2.3.	Immobilisierung von TGF- β_1	18
3.2.3.1.	3-D-HTA-Aldehyd-Objektträger	19

3.2.3.2.	SuperAldehyd-Objektträger	22
3.2.3.3.	SuperEpoxy-Objektträger	22
3.2.3.4.	Aminosilanisierte Objektträger	23
3.2.4.	Immobilisierung von IGF II	24
3.2.5.	Immunologischer Nachweis der Immobilisierung	25
3.2.5.1.	Prinzip der LSAB-Methode	25
3.2.5.2.	Dot blot	26
3.2.5.3.	Durchführung des immunologischen Nachweises an Objektträgern	26
3.2.6.	Bestimmung des Gehalts von TGF- β_1 im Mediumüberstand mittels ELISA	27
3.2.7.	Zellkulturversuche mit löslichem TGF- β_1	29
3.2.7.1.	Fixierung	30
3.2.8.	Zellkulturversuche mit beschichteten Objektträgern	30
3.2.9.	Immunocytologischer Nachweis von α -smooth-muscle Aktin	30
3.2.9.1.	Durchführung der Färbung	31
3.2.9.2.	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	32
3.2.10.	Einfluss der Zelldichte der Vorkultur auf die myofibroblastoide Differenzierungsrate	33
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Immobilisierung von TGF- β_1	34
4.2.	Immobilisierung von IGF II	36
4.3.	Desorption von immobilisiertem TGF- β_1	38
4.4.	Induktion der Differenzierung von NHDF zu Myofibroblasten mit löslichem TGF- β_1	38
4.5.	Induktion der Differenzierung von NHDF zu Myofibroblasten mit immobilisiertem TGF- β_1	39
4.5.1.	3-D-HTA-Aldehyd-Objektträger	39
4.5.2.	SuperAldehyd-Objektträger	41

4.5.3. SuperEpoxy-Objektträger	42
4.5.4. Aminosilanisierte Objektträger	44
4.6. Einfluss der Zelldichte der Vorkultur auf die myofibroblastoide Differenzierungsrate	48
5. Diskussion	49
6. Anhang	57
6.1. Abkürzungen	57
6.2. Lösungen	58
6.3. Literaturverzeichnis	59
6.4. Publikationen	69
6.5. Lebenslauf	71
6.6. Danksagung	72

1.1. Zusammenfassung

Die Regeneration von Weichteilschäden kann in drei Phasen eingeteilt werden, die Inflammation, die Proliferationsphase und das Remodeling. Im Zuge dieser Prozesse kommt es zur Differenzierung gewebeständiger Fibroblasten zu Myofibroblasten. Diese exprimieren, im Gegensatz zu Fibroblasten, α -smooth-muscle-actin. Myofibroblasten besitzen dadurch eine gesteigerte Kontraktionsfähigkeit und tragen somit dazu bei, die Ausdehnung eines Defekts aktiv zu verkleinern. Im Verlauf der normalen Wundheilung sinkt die Anzahl an Myofibroblasten während des Remodelings wieder ab. Geschieht dies nicht, kommt es zu Störungen wie hypertrophen Narben oder zur Ausbildung von Fibrosen. Auch in anderen Organen ist eine erhöhte Anzahl an Myofibroblasten mit der Entstehung von Fibrosen oder Tumoren assoziiert. Somit ist bekannt, dass eine verstärkte Präsenz von Myofibroblasten sowohl einen positiven, als auch einen negativen Einfluss auf das entsprechende Gewebe haben kann.

Die gezielte Induktion bzw. Reduktion der Differenzierung könnte demnach therapeutisch bei der Heilung von Weichteilschäden genutzt werden.

Im Rahmen eines europaweiten Forschungsprojekts („CellPROM“, 5. EU-Forschungsrahmenprogramm), innerhalb dessen sich mehrere Forschergruppen mit der Induktion der Differenzierung verschiedenster Zellen mittels Oberflächen beschäftigten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Induktion der myofibroblastoiden Differenzierung mit Hilfe des Wachstumsfaktors Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1) überprüft. Dabei wurde die Induktion der Differenzierung von normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) auf verschiedene Weise untersucht.

Zum einen wurde lösliches TGF- β_1 zum Medium der Fibroblastenkulturen zugesetzt ($c=1$ ng/ml). Dabei wurde die Differenzierungsrate im Vergleich zur Kontrolle von $15,1 \pm 5,0\%$ auf $35,6 \pm 9,0\%$ gesteigert. Eine weitere Dosissteigerung von TGF- β_1 führte zu vergleichbaren Werten, aber nicht zu einer darüber hinaus gehenden Steigerung der Differenzierungsrate.

Zum anderen wurde TGF- β_1 kovalent an verschiedene Oberflächen gebunden und der Erfolg der Immobilisierung zunächst mit einem Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-

(LSAB)-Test überprüft. Die mit TGF- β_1 beschichteten Oberflächen wurden als Kultivierungssubstrate mit Fibroblastenkulturen in Kontakt gebracht. Zur Immobilisierung wurden zwei verschiedene Aldehydoberflächen, Epoxyoberflächen und aminosilanisierte Oberflächen verwendet. Bei allen Oberflächen, mit Ausnahme der aminosilanisierten, konnte eine Steigerung der Differenzierungsrate auf dem mit TGF- β_1 beschichteten Bereich im Vergleich zum unbeschichteten Bereich erreicht werden. Bei 3-D-HTA-Aldehyd-Objektträgern mit TGF- β_1 lag die Differenzierungsrate mit $20,8 \pm 5,4\%$ signifikant höher als ohne TGF- β_1 ($14,4 \pm 5,4\%$). Bei der mitgeführten Glaskontrolle war die Differenzierungsrate $20,0 \pm 9,4\%$. Bei Superaldehyd-Objektträgern war mit TGF- β_1 eine Steigerung auf $38,2 \pm 5,2\%$ möglich, im Gegensatz zur Kontrolle ohne TGF- β_1 ($28,8 \pm 5,7\%$) und zur Glaskontrolle ($28,7 \pm 5,1\%$). Auch bei Superepoxy-Objektträgern war die Differenzierungsrate mit TGF- β_1 mit $29,1 \pm 3,6\%$ signifikant höher als ohne TGF- β_1 ($23,7 \pm 3,2\%$). Die Differenzierungsrate der Glaskontrolle lag bei $28,6 \pm 4,6\%$. Lediglich bei den aminosilanisierten Objektträgern konnte weder mit TGF- β_1 ($38,4 \pm 3,7\%$) noch ohne TGF- β_1 ($47,6 \pm 5,1\%$) eine Steigerung der Differenzierungsrate gegenüber der Glaskontrolle ($50,6 \pm 8,9\%$) erreicht werden.

Als genereller Einflussfaktor auf die Differenzierungsrate wurde auch die Dichte der Kulturen untersucht. Hier zeigte sich, dass eine dünn ausgesäte vorangehende Kultur in späteren Passagen zu einer erhöhten Differenzierungsrate führte.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum erstem Mal gezeigt werden, dass TGF- β_1 nicht nur in löslicher Form, wie bereits in der Literatur beschrieben, sondern auch in immobilisierter Form geeignet ist, die Differenzierungsrate von Fibroblasten zu Myofibroblasten in vitro zu steigern.

Die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren ist über unterschiedliche Kopplungsschemie möglich, und, wie hier am Beispiel des Insulin-like Growth Factors II gezeigt, auf weitere Proteine übertragbar.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Immobilisierung biofunktionaler Proteine in Zukunft für die praktische Anwendung im Tissue Engineering eine bedeutende Rolle zukommt.

1.2. Summary

The regeneration of soft tissue damage can be divided into three phases: inflammation, proliferation and remodeling. In the course of these processes tissue fibroblasts differentiate into myofibroblasts. These express, in contrast to fibroblasts, α -smooth-muscle actin. Myofibroblasts are able to generate traction forces and thus help to decrease the size of a defect. In the course of normal wound healing the number of myofibroblasts decreases during the remodeling phase. If myofibroblast numbers do not decrease, there will be major problems such as hypertrophic scars or the formation of fibrosis. There are also several other organs, where an increased number of myofibroblasts leads to the development of fibrosis or where it is associated with tumors. It is known that an increased presence of myofibroblasts can have both a positive and a negative influence on a certain tissue.

The selective induction or reduction of differentiation could thus be used therapeutically in the treatment of soft tissue damage.

As part of a pan-European research project ("CellPROM", 5th Research Framework Programme of the European Commission), in which several groups of researchers were aiming to induce the differentiation of various cell types, the present study was focused on the induction of myofibroblast differentiation by using transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). The induction of the differentiation process of normal human dermal fibroblasts (NHDF) into myofibroblasts was examined in several ways.

Soluble TGF- β_1 was added to the medium of fibroblast cultures ($c = 1 \text{ ng/ml}$). In this case, the differentiation rate increased to $35.6 \pm 9.0\%$ compared to the control, showing $15.1 \pm 5.0\%$. A further increase in the dose of TGF- β_1 led to similar values, but did not result in a further increase of the differentiation rate.

In addition, TGF- β_1 was covalently bound to different surfaces and the success of the immobilization was examined with a labelled (Strept) avidin-biotin (LSAB) test first. Treated with TGF- β_1 , coated surfaces were brought into contact with fibroblast cultures as substrates. Different aldehyd-, epoxy- and amino-functionalized slides were used for immobilization. For all slides, except the aminofunctionalized slides an increase in the differentiation rate could be achieved with the TGF- β_1 coated region

compared to the uncoated area. On 3-D-HTA-Aldehyde slides bearing TGF- β_1 , the differentiation rate was $20.8 \pm 5.4\%$, and was significantly higher than without TGF- β_1 , ($14.4 \pm 5.4\%$). On the accompanying glass control the differentiation rate was $20.0 \pm 9.4\%$. On superaldehyd slides with TGF- β_1 , an increase to $38.2 \pm 5.2\%$ was possible, in contrast to the control without TGF- β_1 ($28.8 \pm 5.7\%$) and the glass control ($28.7 \pm 5, 1\%$). Even on superepoxy-slides, the differentiation rate of TGF- β_1 $29.1 \pm 3.6\%$ was significantly higher than on slides without TGF- β_1 ($23.7 \pm 3.2\%$). The differentiation rate of the glass control was $28.6 \pm 4.6\%$. Only on aminofunctionalized slides either with TGF- β_1 ($38.4 \pm 3.7\%$) or without TGF- β_1 ($47.6 \pm 5.1\%$) an increase in the differentiation rate compared to the glass control ($50.6 \pm 8, 9\%$) could be reached.

As a general factor influencing the rate of differentiation, the density of the cell cultures was also investigated. This showed that a less dense seeding led to an increased rate of differentiation in subsequent cell culture passages.

This study demonstrates for the first time that TGF- β_1 is able, not only in its soluble form as described in the literature, but also in an immobilized form, to increase the differentiation rate of fibroblasts into myofibroblasts in vitro.

The immobilization of growth factors is possible by using different coupling chemistry, and is, as shown by the example of insulin-like growth factor II, transferable to other proteins.

It can be assumed that the immobilization of biofunctional proteins will play a prominent role in the future for practical applications in tissue engineering.

2. Einleitung

2.1. Übersicht

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines internationalen Forschungsprojektes innerhalb des 6. Rahmenforschungsprogramms der EU, welches sich Cell Prom (*cell programming by nanoscaled devices*) nennt. Cell Prom wurde im März 2004 gegründet. Es waren 27 Forschergruppen aus 12 Ländern beteiligt. Das Ziel war, die Differenzierung von Zellen zu induzieren, indem man diese mit entsprechenden nanoskaligen funktionalisierten Oberflächen in Kontakt bringt. Innerhalb von CellProm wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Zellen benutzt. Unsere Gruppe hat die Differenzierung von NHDF zu Myofibroblasten mit verschiedenen TGF- β_1 beschichteten Oberflächen untersucht. Fibroblasten differenzieren während der Wundheilung unter dem Einfluss von TGF- β_1 zu Myofibroblasten (MF). Diese Differenzierung kann auch in vitro bei Fibroblastenkulturen durch Zugabe von TGF- β_1 zum Medium induziert werden. Die Induktion dieser Differenzierung soll mit biofunktionalen Oberflächen erreicht werden. Dazu werden verschiedene Oberflächen mit dem Wachstumsfaktor TGF- β_1 beschichtet und mit Fibroblastenkulturen in Kontakt gebracht (Abb. 1).

<u>Wundheilung</u>		<u>Fibrose / Tumor</u>		<u>Ziel</u>
3 Phasen: Inflammation Proliferation Remodeling Differenzierung von Fibroblast zu Myofibroblast unter Einfluss von TGF- β_1		Vermehrt Myofibroblasten Erhöhte Niveaus von TGF- β_1		Beeinflussung der Differenzierung durch biofunktionale Oberflächen
in vivo	in vitro	in vivo		Tissue Engineering

Abb. 1: Überblick: Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten findet in vivo unter dem Einfluss von TGF- β_1 im Rahmen der Wundheilung und bei der Entstehung von Fibrose und Tumoren statt. Die Differenzierung soll in vitro induziert werden, sowohl durch lösliches TGF- β_1 als auch durch biofunktionale Oberflächen.

2.2. Wundheilung

Die Haut stellt eine Schutzbarriere gegen die Außenwelt dar, daher muss jede Verletzung an ihr schnell und effizient repariert werden. Die Wundheilung dient der Wiederherstellung der schützenden und stabilisierenden Funktion der Haut. Die meisten Hautverletzungen heilen innerhalb von 1-2 Wochen, wobei das Endprodukt weder ästhetisch noch funktionell perfekt ist, sondern meist eine Narbe zurückbleibt (Martin 1997).

Die physiologische Wundheilung umfasst eine Reihe sich zeitlich und räumlich überlappender und teilweise parallel ablaufender Prozesse, welche in 3 Phasen eingeteilt werden: Inflammation (Entzündungsphase), Proliferation (Granulationsphase) und Remodeling (Singer und Clark 1999).

1. Phase: Inflammation (Entzündungsphase)

Die entstandene Wunde wird zunächst durch Vasokonstriktion und einen Thrombozytenpfropf verschlossen (Hämostase). Dabei bilden aktivierte Thrombozyten ein blutstillendes Gerinnsel und setzen Wachstumsfaktoren frei (zum Beispiel *platelet derived growth factor* (PDGF) und *transforming growth factor- β_1* (TGF- β_1)). Auch durch die Gerinnungskaskade, das Komplementsystem und Parenchymzellen werden zahlreiche Mediatoren freigesetzt, welche zur Einwanderung von inflammatorischen Leukozyten führen (Heldin und Westermarck 1996). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen reinigen die Wunde von Bakterien und zerstörten Matrix-Komponenten (Brown 1995). Zusätzlich sind Monozyten und Makrophagen eine weitere Quelle für Wachstumsfaktoren, unter anderem TGF- β_1 (Rappolee et al. 1988). Ausgehend von den Wundrändern und Hautanhangsgebilden (Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen) kommt es zur Einwanderung und Proliferation von Keratinozyten.

2. Phase: Proliferation (Granulationsphase)

Neu gebildetes Stroma, Granulationsgewebe genannt, beginnt etwa vier Tage nach der Verletzung, das Wundgebiet auszukleiden. Viele Kapillaren geben dem Gewebe sein körniges Aussehen, weshalb dieses als Granulationsgewebe bezeichnet wird. Makrophagen, Fibroblasten und Blutgefäße wachsen zur gleichen Zeit in das Wundgebiet ein (Roberts und Sporn 1996). Makrophagen sezernieren weitere

Wachstumsfaktoren (zum Beispiel PDGF (Singer und Clark 1999), *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α) (Martin et al. 1992), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) und TGF- β_1 (Werner und Grose 2003)), die notwendig sind für die Angiogeneese und Bildung von Bindegewebe. Fibroblasten bilden neue extrazelluläre Zellmatrix (ECM), die das Einwandern weiterer Zellen ermöglicht und Blutgefäße sorgen für den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen. Vor allem PDGF (Heldin und Westermark 1996) und TGF- β_1 (Hunt 1980) stimulieren zusammen mit ECM-Molekülen (Gray et al. 1993; Xu und Clark 1996) Fibroblasten, die sich im Gewebe um die Wunde befinden, zu proliferieren und in die Wunde einzuwandern. Während der zweiten Phase der Wundheilung differenzieren Fibroblasten zu MF.

3. Phase: *Remodeling* (Wiederherstellung/Reparatur)

MF stellen ihr Expressionsmuster um und synthetisieren Proteine der ECM (Kollagen, Fibronectin). Intrazelluläre zytoplasmatische Aktinfasern und α -smooth-muscle Aktin (α -SMA) interagieren mittels fokaler Adhäsionspunkte mit den Molekülen der ECM. Während des Remodelings können MF kontrahieren und sind so für die Verkleinerung der Wundfläche verantwortlich (Tomasek et al. 2002). Sie sind untereinander über *gap junctions* verbunden (Gabbiani et al. 1978) und bilden so während der Wundheilung mehrzellige, kontraktile Einheiten (Tomasek et al. 2002). Durch Epithelisierung kommt es zum definitiven Wundverschluss, zudem sowohl eine vermehrte Mitoserate der Basalzellschicht, als auch die Migration von Epithelzellen vom Wundrand her beitragen. Auch können neue Epithelzellen von den Hautanhangsgebilden gebildet werden. Die Anzahl der Kapillaren nimmt ab, ebenso die Zelldichte und metabolische Aktivität. Nachdem anfangs vorwiegend Kollagen Typ III gebildet wurde, wird dieses nun durch Kollagen Typ I ersetzt. Im Verlauf kommt es zu einer zunehmenden mechanischen Stabilität, allerdings wird nur noch bis ca. 80% der Stabilität normaler Haut erreicht (Chin et al. 2005). Diese Phase ist die zeitlich längste und kann sich über Jahre hinweg ziehen.

2.2.1. Myofibroblasten in der Wundheilung

1971 wurden MF erstmalig von Gabbiani und Mitarbeitern (Gabbiani et al. 1971) während der Wundheilung im Granulationsgewebe als Zelle mit ultrastrukturellen Eigenschaften zwischen Fibroblast und glatten Muskelzellen beschrieben. Als Ursprung der MF werden neben den Fibroblasten auch glatte Gefäßmuskelzellen, Perizyten und diverse Stromazellen mit myoidem Charakter vermutet. Nach wie vor ist es fraglich, ob nur spezielle Subtypen von Fibroblasten der Differenzierung zu MF unterliegen, oder ob alle Fibroblasten diese Fähigkeit besitzen (Schürch et al. 1998). Im Modell von Tomasek wird angenommen, dass während der Wundheilung durch Änderung der mechanischen Spannung im Gewebe zuerst Proto-MF entstehen, welche noch kein α -SMA enthalten und unter dem zusätzlichen Einfluss von TGF- β_1 soll die myofibroblastoide Differenzierung induziert werden (Tomasek et al. 2002). Experimentelle Untersuchungen belegen, dass Fibroblasten in Kultur in Abhängigkeit ihrer Zelldichte auch ohne den Einfluss von TGF- β_1 zu MF differenzieren (Masur et al. 1996). Demzufolge kann eine Steigerung der Differenzierungsrate auch durch Aussäen der Fibroblasten in geringer Zelldichte induziert werden. MF sind charakterisiert durch eine erhöhte Kollagensynthese (Schürch et al. 1998), die Expression von EDA-Fibronektin (Oyama et al. 1989; Serini et al. 1998) und die Expression einer Isoform des kontraktiven Proteins Aktin, α -SMA (Skalli et al. 1986), welches auch in glatten Muskelzellen vorkommt.

Aktin ist ein weitverbreitetes zytoskelettales Protein, das bei Vorgängen wie Phagozytose, Zellmigration und Kontraktion eine wichtige Rolle spielt. Es treten sechs Isoformen auf, die von verschiedenen Genen kodiert werden und sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden: Die sogenannten *non-muscle* Aktin-Isoformen, β - und γ -cytoplasmatic Aktin, treten im Zytoplasma nahezu aller Zellen auf. Weiterhin existieren vier *muscle* Aktin-Isoformen, die je nach Zelltyp spezifisch sind und so eine Differenzierung verschiedener Muskelzellen ermöglichen. Dies sind α -skeletal Aktin, α -cardiac Aktin, sowie die charakteristischerweise in glatten Muskelzellen auftretenden Isoformen α -SMA und γ -smooth-muscle Aktin (Herman 1993; Vandekerckhove und Weber 1978). Die α -SMA-Isoform wurde sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Perizyten und im kontraktiven Apparat von MF entdeckt und dient zur Unterscheidung zwischen Fibroblasten und MF (Skalli et al. 1989). Bei MF kann sich α -SMA im Zytoplasma zu kontraktiven Bündeln formieren, während sich bei

Fibroblasten Aktin zu flächen- und fingerhaften Fortsätzen zur Fortbewegung anordnen kann (Alberts et al. 1999, Badid et al. 2000).

MF zeichnen sich durch ausgeprägte interzelluläre Verbindungen und hoch entwickelte Zell-Stroma Verbindungen aus, die es diesem Zelltyp ermöglichen, Zugkräfte auf die ihn umgebende ECM auszuüben (Baur und Parks 1983; Schürch et al. 1998; Serini und Gabbiani 1999). In vitro Studien zeigten, dass MF vornehmlich isometrische Zugkräfte ausüben. Es ist anzunehmen, dass in vivo bei der Kontraktion von granulierendem oder fibrosierendem Gewebe ähnliche Prozesse stattfinden (Harris et al. 1981). MF wurde eine wichtige Rolle im Mechanismus der Wundkontraktion zugeschrieben. Man beobachtete diesen Zelltyp bei vielen pathologischen Umbauprozessen, die mit Gewebeuntergang, aber auch -erneuerung einhergehen. Im Laufe der normalen Wundheilung reduziert sich die Zahl der MF wieder, was in einer zellarmen Narbe resultiert (Desmouliere et al. 1995).

α -SMA spielt in der vorliegenden Arbeit eine entscheidende Rolle, da es für die Identifikation der MF verwendet wird. Simmons JG. et al. (1999) zufolge färbt sich nur der Teil der Fibroblasten mit α -SMA-Antikörper in vivo oder in vitro an, der sich zu MF differenziert hat. Dadurch ist es möglich, den Anteil der MF an der Fibroblastenpopulation zu bestimmen. Undifferenzierte Fibroblasten reagieren nicht mit α -SMA-Antikörpern (Tomasek et al. 1999).

2.2.2. Myofibroblasten bei Fibrose und Tumor

Findet keine adäquate Apoptose von MF statt, kommt es zur Bildung einer hypertrophen Narbe, man findet vermehrt MF und eine übermäßige Produktion von ECM. Dieser Vorgang wird Fibrose genannt und resultiert in einer Deformierung des umgebenden Parenchyms (Schürch et al. 1997). MF wurden als pathognomonisches Korrelat der Dupuytren'schen Kontraktur entdeckt (Gabbiani und Majno 1972; Tomasek et al. 2002), sowie bei der Leberzirrhose (Bhathal 1972), Nieren- (Nagle et al 1973) und Lungenfibrose (Adler 1981) nachgewiesen. Weitere Beispiele der fibrotischen Erkrankung sind systemische Sklerose, Arteriosklerose, Fibrosarkom, Gelenkrheumatismus, diabetische Nephropathie, Pankreasfibrose, Peritoneal-Sklerose und Arthrofibrose (Leask und Abraham 2004).

TGF- β_1 war einer der ersten Wachstumsfaktoren, von dem man wusste, dass er bei der Entwicklung von Fibrosen eine Hauptrolle spielt (Border und Noble 1994). Forscher identifizierten erhöhte Niveaus von TGF- β_1 als Auslöser für die Progression von Fibrose, die durch erhöhtes Vorkommen von MF vermittelt wird (Desmouliere et al. 1993; Tomasek et al. 2002). So ist zum Beispiel die Induratio Penis plastica in 86% der Fälle mit einer erhöhten Expression von TGF- β_1 assoziiert (El Sakka et al. 1997). Auch die erhöhte Rate an Fibrose nach Bestrahlung wird durch eine Aktivierung von latentem TGF- β_1 durch ionisierende Strahlung und eine dadurch induzierte MF-Differenzierung erklärt (Barcellos-Hoff et al. 2005).

Als Folge haben sich therapeutische Ansätze auf die Applikation von TGF- β_1 -Antagonisten konzentriert, um eine andauernde Fibrose zu verhindern. Erste, viel versprechende Ergebnisse wurden mit Tierexperimenten erreicht, die Decorin benutzen, lösliche TGF- β_1 -Rezeptor-II-Antagonisten und TGF- β_1 -neutralisierende-Antikörper (Flanders und Burmester 2002).

MF wurden auch in metaplastischen Stromaveränderungen als Reaktion auf Neoplasien (Seemayer et al. 1979) nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass durch ein MF reiches Stroma bei Kolonkarzinom und Mammakarzinom die Invasivität gesteigert wird und α -SMA-Expression bei MF ein positiver Prädiktor für das Wiederauftreten von Kolonkarzinom ist, was mit einer schlechteren klinischen Prognose resultiert (De Wever et al. 2008).

2.3. TGF- β_1

TGF- β_1 ist ein 25 kDa großes Homodimer, welches in einer inaktiven Form, bestehend aus dem TGF- β_1 -Dimer, dem latency associated peptide (LAP) und dem latent TGF- β binding protein (LTBP), sezerniert wird. Das aus sieben Exons und sechs Introns bestehende TGF- β_1 -Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 19 lokalisiert. Die Aktivierung des Wachstumsfaktors kann durch proteolytische Spaltung des LAP vom Dimer im sauren Milieu, oder durch Plasmin oder andere Proteasen erfolgen (Flanders und Burmester 2002; Munger et al. 1997). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von latentem TGF- β_1 in Co-Kulturen aus Endothelzellen und glatten Muskelzellen möglich ist (Sato et al. 1993). TGF- β_1 vermittelt seine biologische Wirkung über Bindung an spezifische

Zelloberflächenrezeptoren, bekannt als TGF- β_1 -Rezeptor I, II und III. Rezeptor III hat eine nichtsignalübertragende Wirkung (Epstein et al. 2000). TGF- β_1 bindet zunächst an den zellmembranständigen TGF- β_1 -Rezeptor II. Diese Bindung induziert eine Heterokomplex-Formation zwischen TGF- β_1 -Rezeptor II, TGF- β_1 -Rezeptor I und TGF- β_1 , welches die Phosphorylierung von TGF- β_1 -Rezeptor I durch die konstitutive Kinase TGF- β_1 -Rezeptor II induziert. Der aktivierte Rezeptorkomplex löst eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Smads aus. Der Name Smad leitet sich von dem bei *Drosophila* gefundenen Protein MAD (*Mothers against Decapentaplegic*) und dem *Caenorhabditis elegans* Protein SMA ab. Diese Reaktion wird bei Smad2/3 durch die Interaktion von SARA (*Smad anchor for receptor activation*) vermittelt. Von den 10 bekannten Smads werden durch den TGF- β -Rezeptor I Smad2 und 3 aktiviert. An die phosphorylierten Transkriptionsfaktoren bindet Co-Smad4. Der Komplex transloziert in den Nukleus und interagiert dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Transkription (Eickelberg et al. 2001, Epstein et al. 2000, Lutz und Knaus 2002, Massagué 2000, Xu und Massagué 2004).

Im Verlauf der Wundheilung sind aktivierte Thrombozyten die erste Quelle für TGF- β_1 . Gleichzeitig wird eine Furin-ähnliche Proprotein-Konvertase freigesetzt, was dann zur TGF- β_1 -Aktivierung führt. Die Hauptfunktion dieser frühen TGF- β_1 -Aktivität ist es, neutrophile Granulozyten und Monozyten ins Wundgebiet zu rekrutieren, um Entzündungsreaktionen in Gang zu bringen (Brunner und Blakytny 2004) (siehe auch 2.2.). Im weiteren Verlauf sind auch aktivierte Makrophagen, Keratinozyten, Endothelzellen und (Myo-) Fibroblasten in der Lage TGF- β_1 zu sezernieren (Brunner und Blakytny 2004; Yang et al. 1999). Die Hauptfunktion dieser späten TGF- β_1 -Aktivität ist die Stimulation der Fibroblastendifferenzierung in MF und damit die Initiierung von Wundkontraktion und Narbenbildung (Brunner und Blakytny 2004).

2.4. Tissue Engineering

Tissue Engineering verbindet Ingenieurwesen und Biowissenschaften mit dem Ziel, lebenden Ersatz für Gewebe und Organe zu entwickeln. Autologe Organ-spezifische Zellen werden entnommen, gefolgt von der therapeutischen Manipulation dieser Zellen *in vitro*. Anschließend erfolgt die Rückgabe der manipulierten Zellen in das Organ des Patienten. Das Resultat ist ein Gewebe, welches sowohl aus kranken, als auch aus modifizierten Zellen besteht (Vacanti 2006).

Haut, Knorpel und Knochen sind Beispiele von Organen, an denen Tissue Engineering in den letzten Jahren klinisch schon mit Erfolg angewendet worden ist. Ziel ist es, in Zukunft die gleichen Erfolge für periphere Nerven, Fettgewebe, Skelettmuskulatur, Bindegewebe, Herzklappen, Blutgefäße und innere Organe wie Bauchspeicheldrüse und Leber zu erreichen (Kopp et al. 2004). Die erfolgreichsten Arbeiten basieren auf Zell-Zell-Wechselwirkungen (Co-Kulturen), Wechselwirkungen der Zellen mit geeigneten Matrices und Wechselwirkungen zwischen Zellen und Wachstumsfaktoren. Alle möglichen Kombinationen dieser Ansätze, wie zum Beispiel die Applikation poröser, biologisch abbaubarer Hydrogel-Gerüste mit integrierten Wachstumsfaktoren sind viel versprechend (Chalfoun et al. 2006; Elisseff et al. 2005; Horch 2006). Die hierzu benötigten dreidimensionalen Trägergerüste können aus verschiedenen Biomaterialien bestehen, natürlichen wie Kollagen (Freyman et al. 2001) oder Alginat (Marijnissen et al. 2002) oder auch synthetischen wie PLGA (*poly lactic-co-glycolic acid*) (Druecke et al. 2004), Hydrogel (Holland et al. 2005) oder Keramiken und Metallen (Mastrogiacomo et al. 2005; Ducheyne und Qiu 1999). Dabei sind die Anforderungen an die Materialien vielseitig. Ein ideales Trägermaterial muss ein dreidimensionales Zellwachstum ermöglichen, biokompatibel und biologisch abbaubar sein. Das Trägergerüst hat nur die Funktion, den Zellen als Leitschiene zu dienen, bis jene zu einem zusammenhängenden Verbund gewachsen sind (Ewers et al. 2003). Nachdem das Trägermaterial abgebaut wurde, besteht das neue Konstrukt so idealer Weise zu 100% aus dem gewünschten Gewebe (Agrawal und Ray 2001).

Bei einigen Anwendungen muss das Trägermaterial die Fähigkeit besitzen, Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen zu ermöglichen. Dies konnte durch die Applikation von Wachstumsfaktoren oder Peptiden in Kombination mit Trägermaterialien realisiert werden (Kim et al. 2000). Im Bereich der

Osteosynthese können Implantate mit TGF- β_1 , *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) und der Integrin-Bindungs-Sequenz RGD beschichtet werden, um damit das Knochenwachstum zu verbessern (Park et al. 2006; Kroese-Deutman et al. 2005; Fischer et al. 2003). Jennissen untersuchte Ansätze, in denen BMP-2 kovalent an säuregeätzte und funktionalisierte Titanlegierungen gekoppelt wird (Jennissen 2002). Der Faktor soll auf diese Weise in einem juxtakrinen Wirkungsschema auf die Umgebung des Implantates einwirken. Folglich soll ein kleiner, adsorptiv gebundener Anteil des Faktors nach Implantation in die Umgebung des Implantates diffundieren, während der größte Anteil durch die kovalente Kopplung oberflächengebunden bleibt und auch nur dort auf Zellen im unmittelbaren Kontakt wirken kann.

Die Mehrheit der veröffentlichten Studien mit immobilisiertem TGF- β_1 arbeitet mit physikalischer Adsorption. Diese ist auf Grund des hydrophoben Charakters von TGF- β_1 sehr fest. Es wurde nachgewiesen, dass TGF- β_1 nach Adsorption an Titan und Titanlegierungen seine Wirkung auf Osteoblasten und glatte Muskelzellen beibehält (Fischer et al. 2003; Müller et al. 2005; Schliephake et al. 2005). Nachteil der passiven Adsorption ist die unkontrollierte Desorption in vivo und im sauren Milieu (Wertz et al. 1996). In vivo lösen sich fast 80% des initialen TGF- β_1 -Gehalts von Titanimplantaten ab (Vehof et al. 2002). Die kovalente Bindung von Proteinen an Oberflächen verhindert unkontrollierte Desorption und kann die Stabilität gegen Biodegradation erhöhen (Müller et al. 2005).

2.5. Strategien für die Proteinimmobilisierung an Oberflächen

Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen Möglichkeiten, Proteine zu immobilisieren. Die einfachste ist die physikalische Adsorption. Sie kommt zustande durch van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen des Proteins und der Oberfläche (Ratner und Hoffmann 2004). Ein Beispiel hierfür ist die Adsorption von Plasmaproteinen an Fremdmaterial bei der Hämodialyse. Bindungen, die auf diesen Wechselwirkungen beruhen, sind unspezifisch und instabil, das Protein kann durch adsorptive Bindung deaktiviert werden.

Ist eine größere sterische Freiheit des immobilisierten Proteins erwünscht oder würde das Protein durch Adsorption deaktiviert werden, besteht die Möglichkeit der

kovalenten Kopplung (Weetall 1976). Durch kovalente Kopplung kann eine höhere Stabilität der Bindung erreicht werden. Hierfür können funktionalisierte Oberflächen mit Amino-, Aldehyd- oder Epoxygruppen verwendet werden. Die Bindung beruht auf der Reaktion von freien Thiol-, Carboxyl-, Hydroxyl- oder Aminogruppen der Peptidketten mit den funktionellen Gruppen an der Oberfläche. In diesem Fall ist das Protein in einer zufälligen, nicht orientierten Weise an die Oberfläche gebunden, wobei die für die Rezeptorerkennung notwendigen Stellen nicht sicher frei zugänglich sind und das Protein (zum Beispiel Wachstumsfaktoren oder Enzyme) seine Funktion verlieren kann. Das Protein kann entweder direkt mit der Gruppe an der Oberfläche reagieren, wie zum Beispiel die Reaktion einer freien Aminogruppe des Proteins mit einer an der Oberfläche befindlichen Aldehydgruppe oder unter Verwendung eines geeigneten Spacers. Spacer sind im Allgemeinen bifunktionelle Moleküle, die als Kopplungsreagenzien eingesetzt werden. Sie gewährleisten durch gleichzeitige Bindung an eine Oberfläche einerseits und an ein biologisch aktives Molekül andererseits für die biologische Funktion notwendige sterische Freiheitsgrade. Die Länge des Spacers kann variiert werden, um unterschiedliche sterische Beweglichkeiten und Bindungsdistanzen zu realisieren. Lineare Spacer können mit gleichartigen (homobifunktionell) oder aber unterschiedlichen funktionellen Gruppen (heterobifunktionell) versehen werden. Beispiele für die Kopplung mit Spacern sind die Immobilisierung eines Proteins an einer aminofunktionalisierten Oberfläche mittels Glutardialdehyd (GDA) (Lee und Mrksich 2002). Eine Möglichkeit für eine spezifischere Bindung ist die Immobilisierung, bei der eine bestimmte Region des Proteins erkannt wird, zum Beispiel die Bindung eines Biotin-gekoppelten Proteins an eine Streptavidin-modifizierte Oberfläche oder die Erkennung von Proteinen durch gebundene Antikörper (Lee und Mrksich 2002). Diese Methoden gewähren eine bessere Kontrolle der Zugänglichkeit der für die Rezeptorerkennung notwendigen Stellen.

2.6. Ziele und Fragestellung

Das grundlegende Ziel dieser Arbeit ist die Induktion zellulärer Differenzierung durch Kontakt mit TGF- β_1 -funktionalisierten Oberflächen.

NHDF dienen hierbei als Modellzelle um die grundsätzliche Möglichkeit, eine Zelldifferenzierung mit immobilisierten Wachstumsfaktoren zu induzieren, zu zeigen. Diese Ergebnisse könnten in Zukunft möglicherweise auf andere Zellen, mit höherem Differenzierungspotential, zum Beispiel Stammzellen, übertragen werden.

Aus diesen Versuchen gewonnene Grundlagen könnten in Zukunft im Bereich des Tissue Engineering angewendet werden.

2.6.1. Differenzierung

In der vorliegenden Arbeit werden als Zelltyp normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) gewählt, weil diese eine entscheidende Rolle während der Wundheilung spielen und ihre Fähigkeit zu MF zu differenzieren ausführlich in der Literatur beschrieben ist. Als Auslöser der MF-Differenzierung werden sowohl TGF- β_1 -Stimulation (Moulin et al. 1998; Martin 1997; Diegelmann und Evans 2004), Änderung der Gewebespannung während der Wundheilung (in vivo) (Hinz et al. 2001), als auch geringe Zelldichte (in vitro) (Masur et al. 1996) diskutiert. Masur et al. (1996) konnten zeigen, dass Fibroblasten bei geringerer Zelldichte eine deutlich höhere Differenzierungsrate als bei höherer Zelldichte hatten. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

Hat auch die Dichte der Vorkultur einen Einfluss auf die spätere MF-Differenzierungsrate?

Kann lösliches TGF- β_1 die Differenzierung von NHDF zu MF induzieren, wie es für Fibroblasten anderen Ursprungs bekannt ist (Serini et al. 1998; Hinz et al. 2004; Masur et al. 1996)?

Welches ist die Dosis an TGF- β_1 , mit der die effektivste Differenzierungsinduktion erreicht werden kann?

2.6.2. Immobilisierung

Kann TGF- β_1 kovalent an verschiedenen funktionalisierten Oberflächen gebunden werden?

Kann das gebundene TGF- β_1 an der Oberfläche nachgewiesen werden?

Löst sich gebundenes TGF- β_1 wieder ab?

Wird eine Steigerung der MF-Differenzierungsrate durch TGF- β_1 beschichtete Oberflächen hervorgerufen?

Ist auf gleiche Weise die Immobilisierung anderer Proteine möglich?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Die zur Durchführung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente benötigten Geräte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Benutzte Geräte und Hersteller

Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	IBS, Wallisellen, Schweiz
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus	Zeiss, Jena
Gefrierschrank -20°C	Privileg, Fürth
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Kühlschrank	Privileg, Fürth
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan, Männedorf, Schweiz
pH-Meter	WTW, Weilheim
Reinstwasseranlage	Sartorius, Göttingen
Rotationsschüttler	Renner, Dannstadt
Spülmaschine	Miele, Gütersloh
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Vortex	GLW, Würzburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellzählgerät Casy	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge	Hermle, Wehingen

3.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die zur Durchführung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 2: Benutzte Chemikalien

Anti-IGF II	Acris, Hiddenhausen
Ascorbinsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
BSA	Roche Diagnostics, Mannheim
DAKO LSAB 2 System HRP	DakoCytomation, Carpinteria, USA
Ethanol, 96%	Roth, Karlsruhe
Glutardialdehyd	VWR ProLabo, Fontenay sous bois, Frankreich
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Ziege-anti-Maus-Cy3	Dianova, Hamburg
HCl	Roth, Karlsruhe
IGF II	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
KCl	Roth, Karlsruhe
Kohrsolin	Bode Chemie, Hamburg
Liquid DAB+Substrate Chromogen System	DakoCytomation, Carpinteria, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
Maus-anti- α -SMA	Sigma, Taufkirchen
Maus-anti-Mensch-TGF- β_1	Sigma, Taufkirchen
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	OXOID, Hampshire, UK
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Austria
Quantum 333	PAA, Pasching, Austria
rHuTGF- β_1	Promokine, Heidelberg

TGF- β_1 ELISA-Kit	DRG, Marburg
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Austria
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield mounting medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel, Braunschweig
3-D-HTA-Aldehyd-OT	Greiner Bio One, Frickenhausen
Einmal-Injektions-Kanüle	BD Biosciences, Heidelberg
Färbeküvetten	Carl Roth, Karlsruhe
Gewebekulturflaschen T75	Greiner, Frickenhausen
Glasflaschen	Schott, Mainz
Glas-OT	Menzel, Braunschweig
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences
Quadriperm	Greiner, Frickenhausen
Spritzenvorsatzfilter, 0,2 μm	Schleicher&Schuell, Dassel
SuperAldehyde-OT	Array It, Sunnyvale, USA
SuperEpoxy-OT	Array It, Sunnival, USA
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um normale humane dermale Fibroblasten, die von der menschlichen Vorhaut eines vierjährigen Kaukasiers stammen und von PromoCell (Heidelberg) erworben wurden (Cat, no C-12300; Charge 1100901.2).

3.2. Methoden

3.2.1. Sterilisation von Materialien und Lösungen

Alle sterilen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt (Zellkultur, Beschichtung der Oberflächen). Mit Spritzenvorsatzfiltern (Porengröße 0,2 µm) wurden kleine Volumina und hitzelabile Lösungen steril filtriert (Ascorbinsäurelösung). Lösungen (Waschpuffer, Phosphstpuffer) und Materialien wurden autoklaviert ($t = 20 \text{ min}$, $T = 121^\circ\text{C}$).

3.2.2. Zellkultur

3.2.2.1. Expansion

Die NHDF wurden in Gewebekulturflaschen (T 75) mit 10 ml Quantum 333 (Q333) kultiviert. Dem Medium wurde 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer (Abb. 2 und 3). Eine Passagierung ist erforderlich, wenn die Gewebekulturflasche konfluent mit Zellen bewachsen ist. Es wurden für alle Versuche nur Zellen bis Passage 10 benutzt.

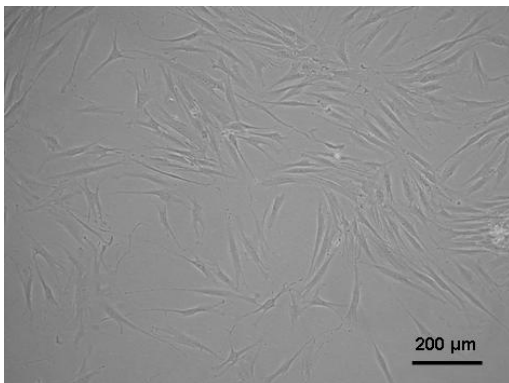


Abb. 2: Mikroskopisches Bild einer NHDF-Zellkultur im Phasenkontrast

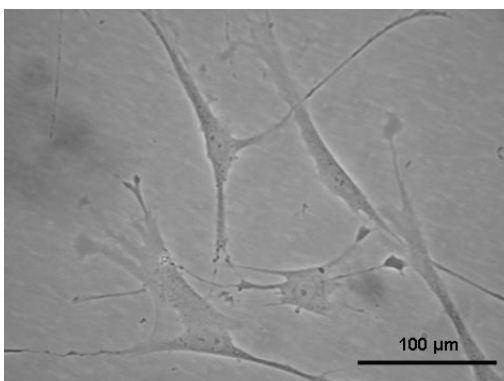


Abb. 3: Makroskopisches Bild einer NHDF-Zellkultur im Phasenkontrast

3.2.2.2. Passagierung

Vor dem Passagieren wurden die benötigten Substanzen im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das Medium wurde abgesaugt, die konfluente Kultur 2 x mit 10 ml PBS (Herstellung siehe Anhang) gewaschen und die Kulturflasche nach Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde am Mikroskop kontrolliert. Die abgelösten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und das Trypsin-EDTA wurde mit 5 ml Q333 durch die darin enthaltenen Proteaseinhibitoren inaktiviert. Nach Zentrifugation ($t = 3 \text{ min}$, $U = 1000 \text{ rpm}$, $T = \text{Raumtemperatur (RT)}$) wurde der Überstand abpipettiert. Nach Zugabe von 4 ml Q333 wurden die Zellen durch Resuspension vereinzelt. Für eine 1:4 Unterkultivierung wurde dann jeweils 1 ml Zellsuspension in 4 mit 9 ml Q333 beschickte Kulturflaschen gegeben.

3.2.2.3. Mediumwechsel

Ein regelmäßiger Mediumwechsel ist im Laufe der Zellkultur erforderlich, da Medium von den Zellen verbraucht oder bei 37°C im Laufe der Zeit inaktiviert wird und außerdem Stoffwechselendprodukte anfallen. Die Häufigkeit eines Mediumwechsels ist abhängig vom Metabolismus, von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und der verwendeten Primärzelle. Ein Mediumwechsel wurde nach zwei Mal pro Woche durchgeführt. Dabei wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und 10 ml auf 37°C erwärmtes frisches Medium zugegeben.

3.2.2.4. Vorbereitung von Glasobjektträgern

Die für die Zellkultur verwendeten OT wurden vor Gebrauch gewaschen. Dazu wurden je 18 OT in einer Glasschaukel über Nacht in Wasser und Glasreinigungsseife gelegt. Am nächsten Tag erfolgte eine zweistündige Wässerung mit fließendem Leitungswasser. Danach wurden die OT für 1 h mit 1% Hydrogenchlorid (HCl) versetzt und erneut 1 h fließend gewässert. Für eine weitere Stunde wurden die OT mit 1% Natriumhydroxid (NaOH) behandelt und für 2 h fließend gewässert. Im Anschluss erfolgte erst eine Spülung der OT mit destilliertem Wasser (Aqua bidest.), danach eine Spülung mit 96% Ethanol. Anschließend wurden

die OT in Aluminiumfolie verpackt, im Trockenschrank getrocknet und abschließend bei 200°C 2 h lang sterilisiert.

3.2.2.5. Kryokonservierung von Zellen

Die mittel- und langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in Form von Kryokulturen. Die Zellen wurden zunächst trypsiniert und anschließend wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff konserviert. Dazu wurden die Zellen wie bei der Passagierung trypsiniert, 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend in 2 ml Einfriermedium (Q333 + 5% Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. DMSO ist eine kryoprotektive Substanz, die die Bildung von zellschädigenden Eiskristallen verhindert (Gross 1968). Je 1 ml der Zellsuspension wurde in einem Kryoröhrchen 24-48 h bei -80°C tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff ($T = -196^{\circ}\text{C}$) gelagert.

3.2.2.6. Kultivierung kryokonservierter Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und die Zellsuspension wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden mit dem Einfriermedium sofort in eine Kulturflasche mit 9 ml 37°C warmem Q333 überführt und zum Anwachsen in den Brutschrank gestellt.

3.2.3. Immobilisierung von TGF- β_1

Für die Immobilisierung von TGF- β_1 wurden aldehyd-, epoxy- und aminofunktionalisierte Oberflächen als Substrat benutzt. Es wurden 2 Arten aldehydfunktionalisierter OT benutzt, 3-D-HTA-Aldehyd-OT und SuperAldehyd-OT. Die Immobilisierung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die TGF- β_1 -Stammlösung wurde gemäß Herstellerangaben in einer Konzentration von 50 µg/ml angesetzt und bei -20°C gelagert. Aus der Stammlösung und Phosphatpuffer (PP, 0,05 M, pH 11 (Herstellung siehe Anhang)) wurde eine Arbeitslösung mit einer TGF- β_1 -Konzentration von 5 µg/ml hergestellt, welche für alle Versuche, wenn nicht anders erwähnt, benutzt wurde. Es wurde immer nur ein Teil des OT in der Größe eines kleinen Deckglases beschichtet und der andere Teil als on-slide-Kontrolle

(interne Kontrolle auf Desorption) frei gelassen (Abb. 4). Eine Steigerung der Differenzierungsrate auch auf dem unbeschichteten Bereich würde für eine Ablösung des Wachstumsfaktors sprechen. Es wurden 10 µl Arbeitslösung auf das Deckglas gegeben und dieses mit Hilfe einer Pinzette auf den OT gelegt. Die Position des Deckglases auf dem OT wurde mit einem Diamantschreiber markiert. Die Immobilisierung wurde erst kurz vor der Durchführung der Zellkulturversuche vorgenommen, um die Lagerungszeit der beschichteten OT bei 4°C so kurz wie möglich zu halten.

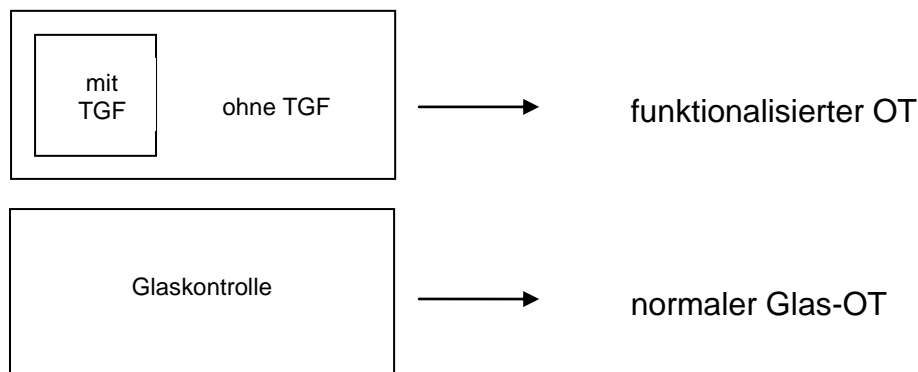


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Es wurde auf den funktionalisierten OT jeweils eine Fläche von der Größe eines kleinen Deckglases beschichtet. Die restliche Fläche des OT war unbeschichtet und diente als on-slide-Kontrolle auf Desorption. Zusätzlich wurde ein Glas-OT als Kontrolle mitgeführt.

3.2.3.1. 3-D-HTA-Aldehyd-Objektträger

3-D-HTA-Aldehyd-OT bestehen aus polymerisiertem Cycloolephin und besitzen eine dreidimensionale Matrix mit einer Höhe von bis zu 50 nm an der Oberfläche, deren Aldehydgruppen geeignet sind, Proteine zu binden. Durch die dreidimensionale Oberfläche sollte das gebundene Protein eine relative dreidimensionale Beweglichkeit besitzen, wodurch es eventuell zu einer besseren Erkennung durch Rezeptoren oder Antikörper kommt. Die Dichte der vorhandenen Aldehyd-Gruppen beträgt $9,1 \times 10^{12}/\text{mm}^2$ (Greiner BioOne).

Der Reaktionsmechanismus besteht aus einem nukleophilen Angriff der Aminogruppe auf die Aldehydgruppe, einer sogenannten Aldimin-Addition. Bei der Reaktion zwischen der NH_2 -Gruppe des TGF- β_1 und der Aldehydgruppe des OT entsteht eine Schiff'sche Base, welche mit Hilfe von zum Beispiel Ascorbinsäure zu einer kovalenten Bindung reduziert werden kann (Abb. 6).

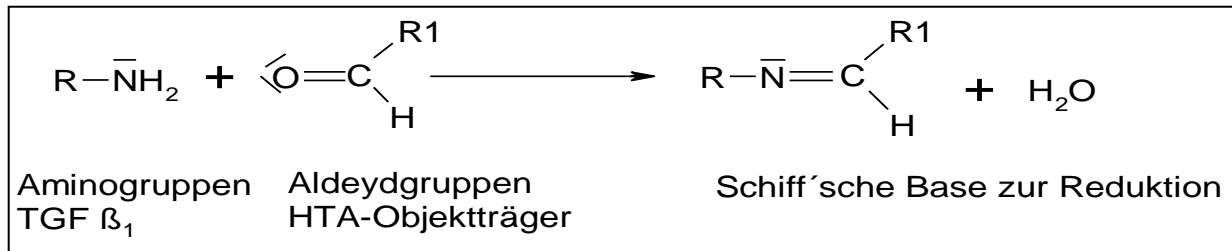


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aldimin-Addition. Die nachfolgende Reaktion der Doppelbindung führt zur hydrolysestabilen Einfachbindung.

Es wurden sowohl planare OT für Zellkulturversuche, als auch solche mit 12 Kavitäten für den Nachweis der Kopplung benutzt.

Durchführung der Immobilisierung an planaren 3-D-HTA-Aldehyd-OT

Nachdem die Arbeitslösung aufgetragen wurde, wurden die 3-D-HTA-Aldehyd-OT in eine sterile Quadripermuschale gelegt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C im Brutschrank. Wegen der Verdunstungsgefahr wurde eine freie Kammer der Quadriperm mit Waschpuffer (Herstellung siehe Anhang) befüllt. Nach Inkubationsende wurde das überschüssige TGF- β_1 mit Waschpuffer abgespült. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die On-Slide-Kontrollen nicht mit TGF- β_1 in Kontakt kamen. Danach wurde mit 4 ml Waschpuffer kurz gewaschen. Anschließend wurden die dabei entstandenen Schiff'schen Basen mit Ascorbinsäurelösung (5 mM, Herstellung siehe Anhang) zu einer kovalenten Bindung reduziert. Hierzu wurden 5 ml Ascorbinsäurelösung auf den OT gegeben und für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es wurde 6 x mit je 4 ml Waschpuffer kurz gewaschen. Danach wurden persistierende Aldehydgruppen auf dem kompletten OT mit den im Medium Q333 enthaltenen Proteinen geblockt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurde einmal kurz gewaschen. Dann folgte ein erneuter Reduktionsschritt mit Ascorbinsäurelösung. Anschließend wurde einmal 5 min in 5 ml PBS gewaschen und die OT wurden zum Trocknen unter die Sterilbank gelegt.

Durchführung der Immobilisierung an 3-D-HTA-Aldehyd-OT mit 12 Kavitäten

An diesen OT wurde TGF- β_1 in einer Konzentrationsreihe immobilisiert, um eine Dosisabhängigkeit der Immobilisierung zu zeigen. Alle Schritte wurde analog zu den planaren 3-D-HTA-Aldehyd-OT durchgeführt. Es wurden TGF- β_1 -Lösungen mit den

Konzentrationen $c = 5 \mu\text{g/ml}$; $2,5 \mu\text{g/ml}$; $1,25 \mu\text{g/ml}$; $0,625 \mu\text{g/ml}$; $0,3125 \mu\text{g/ml}$ und $0 \mu\text{g/ml}$ benutzt. Von allen Lösungen wurden jeweils $20 \mu\text{l}$ in eine Kavität gegeben. Anschließend wurde ein *labeled streptavidin biotin* (LSAB)-Nachweis (s. 3.2.5.) zur Überprüfung des Erfolges der Immobilisierung durchgeführt.

3.2.3.2. SuperAldehyd-Objektträger

Auch die SuperAldehyd-OT tragen Aldehydgruppen an ihrer Oberfläche, wobei über die genaue Struktur keine Informationen verfügbar sind. Die Dichte der Aldehydgruppen beträgt $5 \times 10^{12}/\text{mm}^2$ (www.arrayit.com). Die Bindung von Proteinen an SuperAldehyd-OT erfolgt nach dem gleichen Reaktionsschema wie an 3-D-HTA-Aldehyd-OT. Diese OT bestehen allerdings im Gegensatz zu 3-D-HTA-Aldehyd-OT aus Glas.

Durchführung der Immobilisierung an SuperAldehyd-OT

Die Kopplung von TGF- β_1 an SuperAldehyd-OT erfolgte analog der Kopplung an 3-D-HTA-Aldehyd-OT (siehe 3.2.3.1.).

3.2.3.3. SuperEpoxy-Objektträger

Die Epoxygruppe kann mit unterschiedlichen Nukleophilen wie primäre Aminogruppen, Sulfhydrylgruppen und Hydroxylgruppen zu einer sekundären Aminbindung, einer Thioesterbindung oder einer Etherbindung reagieren. Welche Reaktion bevorzugt abläuft ist abhängig vom pH - Wert. Bei einem pH - Wert von 11 kommt es überwiegend zu sekundärer Aminbindung und Etherbindung (Abb. 7) (Hermansson GT. 1996).

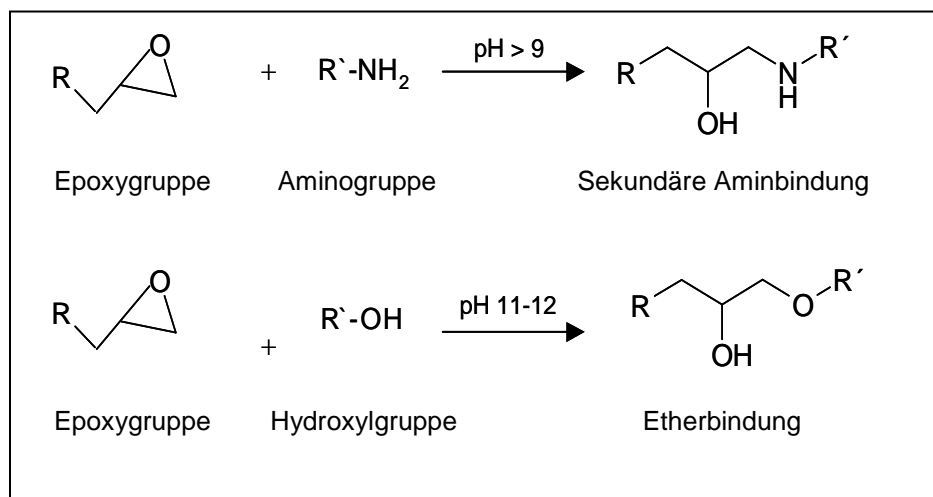


Abb. 7: Schematische Darstellung der bevorzugten Reaktionen der Epoxide bei pH 11.

Durchführung der Immobilisierung an SuperEpoxy-OT

Nach Auftragen der TGF- β_1 -Arbeitslösung wurden die OT 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde 3 x mit je 5 ml Waschpuffer kurz gewaschen. Die persistierenden Epoxygruppen wurden 1 h mit Q333 bei RT geblockt. Dann wurde 3 x kurz mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die OT luftgetrocknet. Auf die gleiche Weise wurden SuperEpoxy-OT mit Kopplungslösungen verschiedener pH Werte (7, 9, 11) beschichtet. Dadurch sollte ein eventueller Unterschied der Kopplungseffizienz überprüft werden.

3.2.3.4. Aminosilanisierte Objektträger

Aminosilanisierte OT tragen an ihrer Oberfläche Aminogruppen, welche, im Gegensatz zu Aldehydgruppen, nicht direkt mit einer anderen Aminogruppe reagieren können. Es wird zuerst der homobifunktionelle Spacer Glutardialdehyd an die OT gebunden, welcher 2 Aldehydgruppen besitzt, wovon eine unter Bildung einer Schiff'schen Base mit der Aminogruppe am OT reagieren kann. Die zweite Aldehydgruppe kann in einem zweiten Reaktionsschritt wiederum unter Bildung einer Schiff'schen Base mit einer Aminogruppe des zu immobilisierenden Proteins reagieren (Abb. 8).

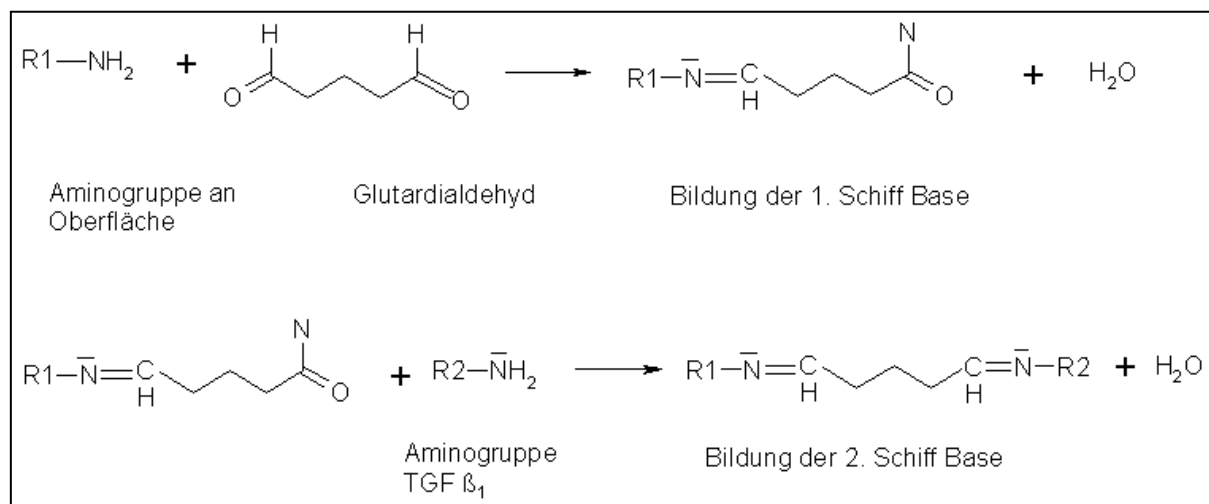


Abb. 8: Schematische Darstellung der Reaktion der aminosilanisierten OT. Da die Aminogruppen von TGF- β_1 und OT nicht direkt miteinander reagieren können wird GDA als Spacer benutzt.

Die Aminosilanisierung von OT wurde vom Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik (IBMT) in Potsdam-Golm durchgeführt. Hierzu wurde der pH - Wert der verwendeten 3-Aminopropyltriethoxysilan-Lösung (APTS, 10% in H_2O_{dd} , Fluka, Buchs, Schweiz) auf 3,5 eingestellt. Normale Glas-OT wurden in frisch hergestellte Piranha-Lösung (Herstellung siehe Anhang) gelegt und 10 min inkubiert, um die Oberfläche zu aktivieren. Anschließend folgte 1 h Inkubation in 10 M NaOH. Nachdem die OT vorsichtig mit Aqua dest. gespült wurden, wurden sie 1 h bei 80°C in APTS-Lösung gelegt und anschließend wieder mit Aqua dest. und Aceton gespült. Schließlich wurden sie 1 h bei 115°C inkubiert, erneut mit Aqua dest. gespült und zentrifugiert, um das Wasser zu entfernen.

Durchführung der Immobilisierung an aminosilanisierten OT

10 µl GDA-Lösung ($c = 1,25\%$ in PP, Herstellung siehe Anhang) wurden auf ein Deckglas gegeben und dieses wurde auf den OT gelegt. Die Lage des Deckglases wurde mit einem sterilisierten Diamantschreiber markiert. Es folgten 2 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Danach wurde 1 x kurz mit PP gewaschen. Anschließend wurden 10 µl TGF- β_1 -Beschichtungslösung mit einem Deckglas auf die markierte Stelle gegeben.

Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu dem Vorgehen bei den Experimenten mit 3-D-HTA-Aldehyd-OT.

3.2.4. Immobilisierung von IGF II

Um zu zeigen, dass die Technik zur Immobilisierung universell einsetzbar ist, wurde IGF II als weiteres Protein immobilisiert. Es wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml verwendet. Dazu wurden aminosilanisierte OT und SuperAldehyd-OT benutzt. Die Beschichtung wurde wie für TGF- β_1 beschrieben durchgeführt.

3.2.5. Immunologischer Nachweis der Immobilisierung

3.2.5.1. Prinzip der LSAB-Methode

Der Nachweis der Immobilisierung erfolgte mit der LSAB-Methode. Diese Methode nutzt die starke Affinität von Streptavidin für Biotin zur Kopplung enzymmarkierten Streptavidins an biotinylierte Sekundärantikörper. Streptavidin (hergestellt aus *Streptomyces avidinii*) ist ein Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin, wodurch eine hohe Sensitivität erreicht wird. Bei der LSAB-Methode bindet zuerst ein Primärantikörper (Maus-anti-Mensch-TGF- β_1 bzw. Maus-anti-Mensch-IGF II) an das Antigen (TGF- β_1 bzw. IGF II) und bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex. Der Sekundärantikörper (Link-Lösung, anti-Maus/anti-Kaninchen) bindet an den Primärantikörper, welcher nun als Antigen fungiert. Das an diesen zweiten Antikörper gebundene Biotin ist in der Lage, das Peroxidase-konjugierte Streptavidin zu binden. Durch die enzymatische Reaktion des 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorids (DAB) mit der Meerrettichperoxidase, bei der ein braunes Reaktionsprodukt entsteht, können die Immunkomplexe sichtbar gemacht werden (Abb. 9).

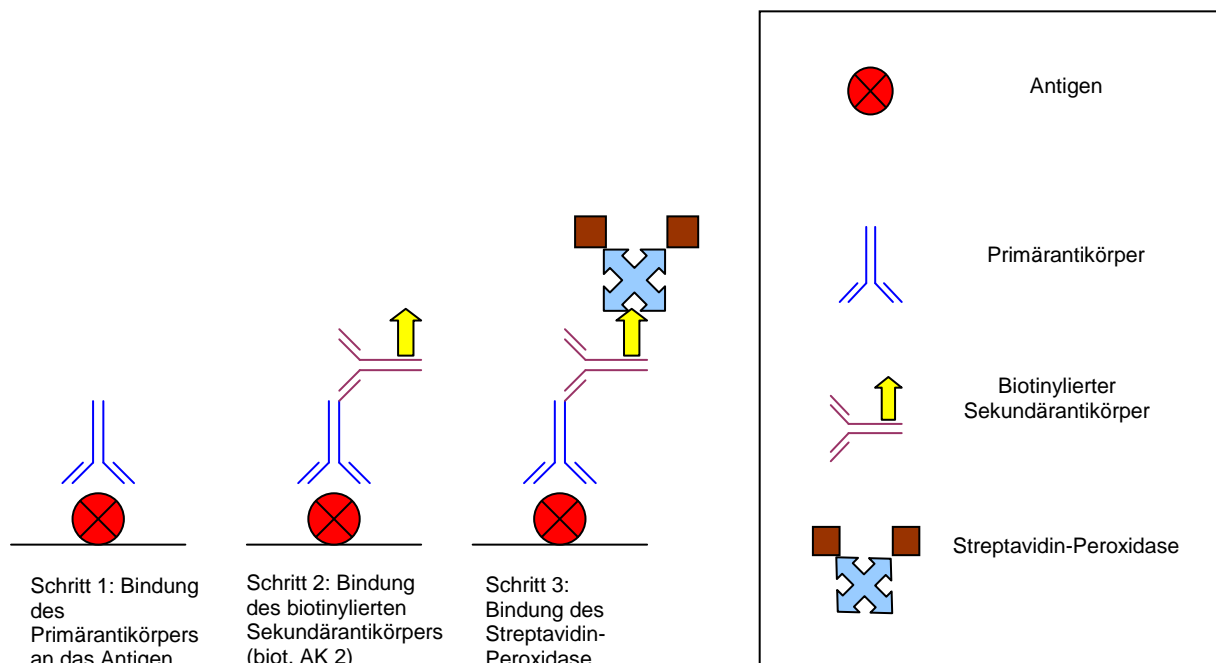


Abb. 9: Schematische Darstellung der LSAB-Methode.

3.2.5.2. Dot blot

Um die Eignung des LSAB-Kits von DakoCytomation für den Nachweis von TGF- β_1 zeigen zu können, wurde ein Dot Blot auf einer Nitrozellulosemembran durchgeführt. Dazu wurden 3 Spots mit je 2,5 μ l TGF- β_1 -Lösung verschiedener Konzentration ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ und $0,1 \mu\text{g/ml}$ in PP $0,05 \text{ M}$, $\text{pH } 11$) und 1 Spot mit 2,5 μ l PP ($0,05 \text{ M}$, $\text{pH } 11$) als Negativkontrolle auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert. Die Lage der Spots wurde mit einem Bleistift markiert. Nachdem die Membran trocken war, wurde sie zusammen mit 500 μ l 1% *bovine serum albumin* BSA (= Rinderserumalbumin) in PBS in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und 1 h auf einem Überkopf-Rotationsschüttler inkubiert. Um die gleichmäßige Befeuchtung sicherzustellen, wurden alle folgenden Inkubationen auf dem Überkopf-Rotationsschüttler durchgeführt. Anschließend wurde die Flüssigkeit dekantiert. Der Primärantikörper Maus-anti-Mensch-TGF- β_1 (50% Glycerol-Stammlösung, $c = 250 \mu\text{g/ml}$) wurde 1:50 mit 0,1% BSA in PBS verdünnt. Davon wurden 500 μ l in das Reaktionsgefäß gegeben und anschließend 30 min inkubiert. Nachdem 3 x 5 min mit TRIS-Puffer (Herstellung siehe Anhang) gewaschen wurde, wurde 10 min mit 500 μ l Link-Lösung aus dem LSAB-Kit inkubiert. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen, 500 μ l Streptavidin-Peroxidase aufgetragen und wiederum 10 min inkubiert. Nach weiteren 3 x 5 min waschen, wurden 500 μ l DAB-Arbeitslösung (Herstellung siehe Anhang) dazugegeben und 30 min inkubiert. Abschließend wurde noch 3 x 5 min mit Aqua dest. gewaschen.

3.2.5.3. Durchführung des immunologischen Nachweises an Objektträgern

Es wurden die gleichen Lösungen wie im Abschnitt Dot Blot beschrieben benutzt. Zuerst wurden die OT 5 min mit 5 ml TRIS-Puffer in einer Quadripermschale gewaschen. Anschließend wurde mit 75 μ l 0,1% BSA in PBS 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurden 75 μ l des Primärantikörpers aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer, gefolgt von 3 fünfminütigen Waschschritten. Danach wurden 75 μ l Link-Lösung aufgetragen und 10 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 3 x 5 min gewaschen. Nun wurden 75 μ l Streptavidin-Peroxidaselösung aufgetragen und 10 min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert und nachfolgend gewaschen (3 x 5

min). Schließlich wurden 75 µl DAB-Arbeitslösung aufgetragen und bei RT 30 min inkubiert. Dabei wurden die OT immer mit einem großen Deckglas bedeckt. Nach 30 min wurde die Lösung mit Aqua dest. abgespült.

3.2.6. Bestimmung des Gehalts von TGF- β_1 im Mediumüberstand mittels ELISA

Um eine eventuelle Desorption von kovalent gebundenem TGF- β_1 zu überprüfen wurden beschichtete SuperAldehyd-OT 48 h in Q333 inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben vom Medium entnommen, deren Gehalt an TGF- β_1 später bestimmt wurde. Dazu wurden 3 SuperAldehyd-OT mit je 50 µl TGF- β_1 ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), wie unter 3.2.3.2. beschrieben, beschichtet. Die OT wurden in die Kammern 1, 2 und 3 einer Quadriperm gelegt. Anschließend wurden in alle 4 Kammern je 4 ml Q333 gefüllt, 1 ml Q333 wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und dieses bei -20°C gelagert, um daraus den Ausgangswert an TGF- β_1 in Q333 zu bestimmen. Die Quadripermschale wurde in den Brutschrank gestellt. Nach 6 h wurden je 1 ml Q333 aus Kammer 1 und 4 entnommen, nach 24 h je 1 ml aus Kammer 2 und 4 und nach 48 h je 1 ml aus Kammer 3 und 4. Tabelle 4 zeigt den Ablauf der Probenahme.

Tab. 4: Probe und Entnahmezeitpunkte des Desorptionsversuchs.

Kammer	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
Inhalt	TGF- β_1 - OT + Q333	TGF- β_1 - OT + Q333	TGF- β_1 - OT + Q333	Q333
Zeitpunkt der Probenahme	6 h	24 h	48 h	6 h, 24 h, 48 h

Alle Proben wurden sofort bei -20°C gelagert. Der Gehalt an latentem und aktivem TGF- β_1 in den Proben wurde mit einem TGF- β_1 ELISA-Kit nach dem Sandwich-Prinzip bestimmt. Dabei befindet sich am Boden der Wells ein anti-TGF- β_1 Antikörper, an den das eventuell in der Probe befindliche TGF- β_1 bindet. Nach dem Waschen verbleibt nur gebundenes TGF- β_1 im Well und ein Maus-anti-TGF- β_1 Antikörper, der zugegeben wird, kann daran binden. Ein mit Biotin konjugierter Anti-Maus-Antikörper bindet wiederum daran. Biotin hat eine hohe Affinität zu Streptavidin, deren Peroxidase schließlich das zugegebene Substrat enzymatisch umwandelt, was zu einem Farbumschlag führt. Durch Messung der Extinktion und

Vergleich dieser zu den Werten einer Standardkurve, kann man feststellen, wie viel TGF- β_1 sich in einer Probe befunden hat. Die Erfassungsgrenze des Tests liegt bei 19 pg/ml. Da mit dem Kit nur aktives TGF- β_1 bestimmt werden kann, muss latentes TGF- β_1 zuerst durch Ansäuern in die aktive Form umgewandelt werden, um beide Formen des TGF- β_1 erfassen zu können.

Durchführung der Messung

Die Mediumproben wurden aufgetaut und alle benötigten Reagenzien und Wells auf RT gebracht. Das Assay Buffer-Konzentrat wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Die konzentrierte Waschlösung wurde 1:40 mit Aqua dest. verdünnt. Anschließend wurde eine serielle Verdünnung des Standards mit bekannter TGF- β_1 -Konzentration ($c_{\text{TGF-}\beta_1} = 600 \text{ pg/ml}$) zum Erstellen der Eichkurve (Tabelle 5) angefertigt.

Tab 5: Ansetzen der Eichkurve.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration TGF- β_1 [pg/ml]
Standard A	1 ml Standard	600
Standard B	0,5 ml Standard A + 0,5 ml Assay Buffer	300
Standard C	0,5 ml Standard B + 0,5 ml Assay Buffer	150
Standard D	0,5 ml Standard C + 0,5 ml Assay Buffer	75
Standard E	0,5 ml Standard D + 0,5 ml Assay Buffer	38
Standard F	0,5 ml Standard E + 0,5 ml Assay Buffer	19
Standard G	1 ml Assay Buffer	0

Alle Mediumproben wurden 1:2 mit dem Assay Buffer verdünnt. Als Positivkontrolle wurde ein Testserum ($c_{\text{TGF-}\beta_1} = 7,76 \text{ ng/ml}$, Sollbereich 4,65–10,86 ng/ml) 1:50 mit Assay Buffer verdünnt. Die Proben zur Messung von latentem TGF- β_1 , die Positivkontrolle und die Standards wurden anschließend angesäuert und wieder neutralisiert. Es wurden je 200 μl vorverdünnte Probe beziehungsweise Standard in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, je 20 μl 1M HCl hinzugegeben, gründlich gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisierung wurden je 20 μl 1M NaOH hinzugefügt und ebenfalls gründlich gemischt. Der pH-Wert aller Proben muss zwischen 7 und 8 liegen, daher wurde dieser mit Indikatorpapier überprüft und gegebenenfalls mit NaOH bzw. HCl titriert. Die benötigte Anzahl von Wells wurde in

der Halterung befestigt. Je 100 µl der zu messenden Lösungen wurden auf den Boden der Wells pipettiert, diese mit einer Folie abgeklebt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Wells ausgeschüttet und 3 x mit 300 µl Waschlösung je Well gewaschen, wobei verbleibende Wassertropfen durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernt wurden. Es wurden 100 µl Antiserum (monoklonaler Maus-anti-TGF- β_1 -Antikörper) in jedes Well gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde 3 x mit Waschlösung gewaschen und 100 µl Enzym-Konjugat (Anti-Maus-Biotin) in jedes Well gegeben und 45 min bei RT inkubiert. Es wurde wieder 3 x gewaschen und für 45 min 100 µl Enzym-Komplex (Streptavidin-Peroxidase) in jedes Well gegeben. Es folgten weitere 3 Waschschrte. Danach wurden 100 µl Substrat-Lösung (3,3-5,5-Tetramethylbenzidin) in jedes Well gegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von je 50 µl Stop Solution in jedes Well abgestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte innerhalb von 10 min im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 ± 10 nm.

3.2.7. Zellkulturversuche mit löslichem TGF- β_1

Um die Induktion der myofibroblastoiden Differenzierung durch lösliches TGF- β_1 bei NHDF zu zeigen und die dafür notwendige minimale Dosis zu ermitteln, wurden Zellkulturversuche durchgeführt. Unbeschichtete Glas-OT wurden in eine sterile Quadripermschale gegeben. Die Zellen wurden an Tag 0 angesetzt. Es wurden 8 ml frisches Medium zugegeben und zum Vereinzeln der Zellen wurde mit einer Pasteurpipette gemischt. Die Zellzählung erfolgte mit einem Casy Zellzählsystem. Es wurden 15 Zellen/mm² (30000 Zellen in 4 ml Medium je OT) ausgesät, wobei dem Medium TGF- β_1 in einer Endkonzentration von 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 25 ng/ml zugegeben wurde. An Tag 2 wurde ein Mediumwechsel mit erneuter TGF- β_1 Supplementierung durchgeführt. An Tag 4 wurden die Zellen fixiert.

3.2.7.1. Fixierung

Bevor kultivierte Zellen immunzytologisch gefärbt werden können, ist es nötig diese zu Fixieren. Zur Entfernung des Mediums wurde 2 mal kurz mit 5 ml 37°C warmem PBS gewaschen und danach 5 min in 5 ml hypotonem Kaliumchlorid (KCl) (0,05 M) bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wodurch die Zellen quellen und so das Eindringen der Antikörper bei der späteren Immunfärbung erleichtert wird. Anschließend wurde 10 min in eiskaltem Methanol in einer Färbeküvette bei -20 °C fixiert. Die OT wurden luftgetrocknet und mit 70 µl Glycerin-PBS (1:10) eingedeckt und bis zur Färbung bei 4°C aufbewahrt.

3.2.8. Zellkulturversuche mit beschichteten Objektträgern

Zur Überprüfung der Aktivität der beschichteten Oberflächen wurden Zellkulturversuche durchgeführt. Dazu wurden die beschichteten OT, sowie unbeschichtete Glas-OT als Kontrolle, in eine sterile Quadripermschale gegeben. Es wurden 63 Zellen/mm² (125000 Zellen je OT) ausgesät und ohne weiteren Mediumwechsel bis zur Fixierung an Tag 2 inkubiert.

3.2.9. Immunozytologischer Nachweis von α -smooth-muscle Aktin

Zum Nachweis von α -SMA in den Zellen wurde die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Probe wird zuerst mit einem spezifischen Antikörper inkubiert (anti- α -SMA). Dann wird der mit Farbstoff (Indocarbocyanin (Cy3)) gekoppelte zweite Antikörper hinzugegeben, für den der erste Antikörper als Antigen fungiert. Im Fluoreszenzmikroskop wird die Probe mit einer für den Farbstoff charakteristischen Anregungswellenlänge angeregt und emittiert Licht in einer für den angeregten Farbstoff charakteristischen Wellenlänge. Das Absorptionsmaximum für Cy3 liegt bei 550 nm, die charakteristische rote Farbe wird durch Emission bei 570 nm erzeugt. Die Zellkerne werden mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff 4,6-Diamidino-2-phenyl-di-hydrochlorid (DAPI) blau (Absorptionsmaximum bei 358 nm, Emissionsmaximum bei 461 nm) gegengefärbt.

3.2.9.1. Durchführung der Färbung

Nachdem die OT 3 x 5 min in PBS-Tween 20 (0,5%) gewaschen worden sind, wurde zur Reduktion unspezifischer Signale 30 min mit BSA-PBS (0,1%) geblockt. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten dunklen Kammer durchgeführt. 75 μ l Maus-anti-Mensch- α -SMA (1:800 in BSA-PBS (0,1%)) wurden mit einem großen Deckglas für 30 min aufgetragen. Nach 3 Waschschritten mit PBS-Tween 20 (0,5%) wurden 75 μ l Ziege-anti-Maus-Cy3 (1:400 in BSA-PBS (0,1%), $t = 30$ min) aufgetragen. Vor der Fixierung mit Paraformaldehyd (4% in PBS, $t = 5$ min) auf einen Rotationsschüttler, wurde 3 x gewaschen, um den ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach erfolgten weitere 3 Waschschrritte. Nach der Dehydrierung der Proben mit Ethanol (70%, 80%, 96%, $t = 5$ min) und anschließendem Trocknen, wurden diese mit 25 μ l *Vectashield Mounting medium with DAPI* ($C_{\text{DAPI}} = 1,5 \mu\text{g/ml}$) eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei -20°C gelagert.

Abb. 10 zeigt ein mikroskopisches Bild eines MF und mehrerer Fibroblasten nach Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Cy3 markierten Sekundärantikörper und DAPI in einer vierhundertfachen Vergrößerung. Es ist deutlich zu erkennen, dass der MF im Gegensatz zu den Fibroblasten eine Vielzahl α -SMA-Fasern bildet.

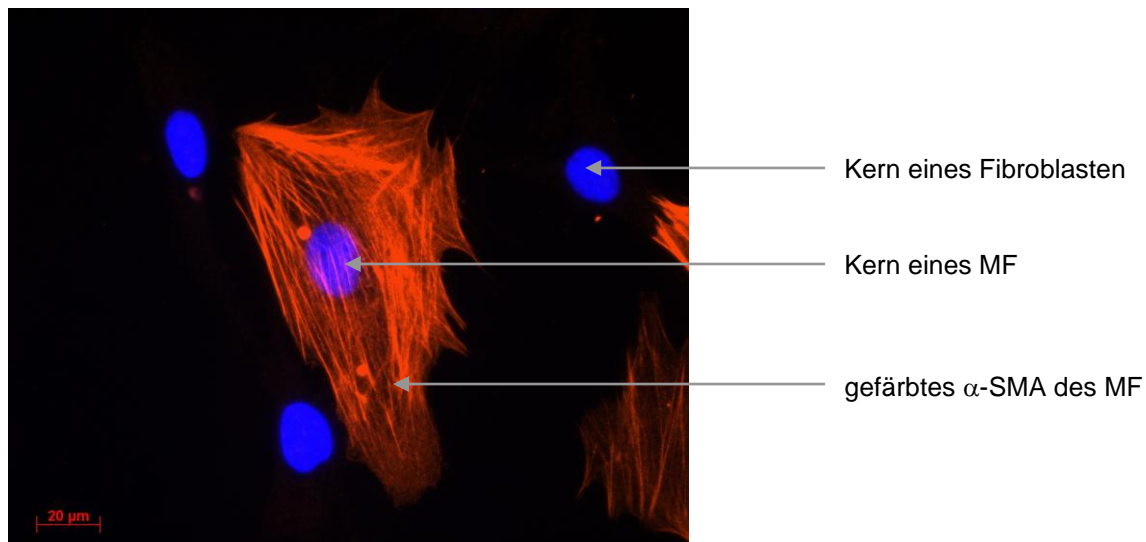


Abb. 10: Mikroskopisches Bild eines MF und mehrerer NHDF nach Immunfluoreszenz-Färbung mit markiertem Sekundärantikörper und DAPI

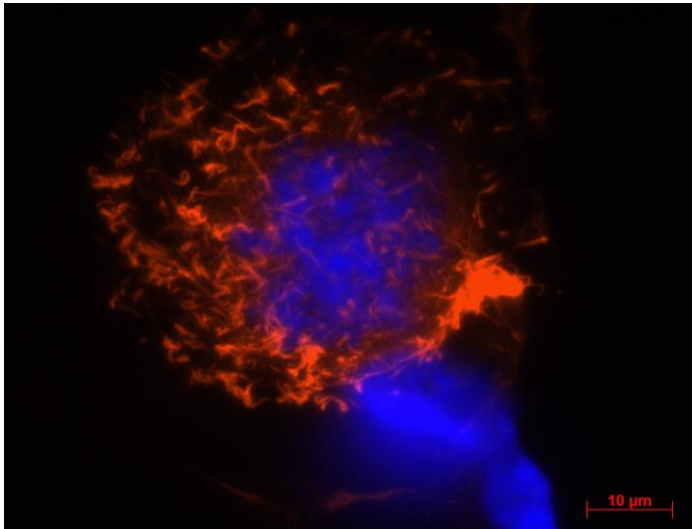


Abb 11: Mikroskopisches Bild eines MF in Mitose nach Immunfluoreszenz-Färbung mit markiertem Sekundärantikörper und DAPI

3.2.9.2. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Bei der Auswertung aller Objektträger wurden folgende Parameter bestimmt:

MF-Differenzierungsrate als prozentualer Anteil von α -SMA-positiven Zellen an der Gesamtzahl aller Zellen. Zur Gruppe der MF wurden solche Zellen zugeordnet, die rot gefärbte Filamente aus α -SMA gebildet hatten. Zellen, bei denen nur der blaue Kern zu sehen war wurden den Fibroblasten zugeordnet. Es wurde mit 40-facher Vergrößerung mikroskopiert und immer mindestens 400 Zellen/Probe ausgezählt und zugeordnet.

Zelldichte als Zellzahl/Gesichtsfeld. Hierfür wurde die Anzahl der Kerne je Gesichtsfeld bei 40facher Vergrößerung bestimmt und der Mittelwert aus 20 Gesichtsfeldern gebildet.

Mitosen als prozentualer Anteil der Zellen, die sich in Mitose befinden je 400 Zellen, um einen möglichen Einfluss von TGF- β_1 auf die Mitoserate zu ermitteln.

Diese Parameter wurden auf Glas-OT bestimmt und auf den funktionalisierten OT sowohl auf dem markierten beschichteten Bereich, als auch auf dem unbeschichteten Abschnitt des OT. Die Auswertung des unbeschichteten Bereichs soll als funktioneller Test (on-slide-Kontrolle) auf Desorption dienen und einen Einfluss des TGF- β_1 auf alle Zellen der Kammer überprüfen (siehe Abb. 4).

Zur statistischen Absicherung wurden t-Tests auf Vorliegen von Paardifferenzen durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei 0,05.

3.2.10. Einfluss der Zelldichte der Vorkultur auf die myofibroblastoide Differenzierungsrate

Aus der Literatur ist bekannt, dass die MF-Differenzierungsrate bei hoher Zelldichte gering ist (Masur et al). Wir haben erstmals untersucht, ob auch die Dichte der vorangehenden Kultur (= Vorkultur) einen Einfluss auf die spätere MF-Differenzierungsrate hat.

Es wurden 4 großen Kulturflaschen mit NHDF unterschiedlicher Zahl angesetzt (100 µl, 250 µl, 500 µl, 1 ml Zellsuspension je 10 ml Q333). Alle Kulturflaschen wurden inkubiert, bis in der Flasche mit dem höchsten Volumen ein konfluenten Monolayer gewachsen war. Nach der Trypsinierung wurde vor dem erneuten Aussäen die Zellzahl jeder Flasche bestimmt. Danach wurden aus den Zellen jeder Flasche zwei Glas-OT mit der gleichen Zelldichte von 15 Zellen/mm² (30000 Zellen je OT) angesetzt. An Tag 2 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. An Tag 4 wurden die Zellen fixiert.

4. Ergebnisse

4.1. Immobilisierung von TGF- β_1

Der Erfolg der Immobilisierung an die verschiedenen funktionalisierten Oberflächen wurde mit der LSAB-Methode überprüft (siehe Kap. 3.2.5.1.). Um die Eignung des verwendeten LSAB-Kits sicherzustellen wurde zunächst ein Dot Blot (siehe Kap. 3.2.5.2.) durchgeführt. Bei einer TGF- β_1 -Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ war ein deutliches braunes Präzipitat zu sehen, bei 1 $\mu\text{g/ml}$ nur noch ein schwaches und bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ kein Signal (Abb. 12).



Abb. 12: Dot blot auf einer Nitrozellulosemembran mit verschiedenen Konzentrationen von TGF- β_1 ($c = 5; 1; 0,1$ und $0 \mu\text{g/ml}$).

Beim Nachweis der Immobilisierung an den verschiedenen Substraten variierten die Ergebnisse. Bei den planaren 3-D-HTA-Aldehyd-OT war sowohl mit der Standard-Konzentration der Beschichtungslösung von 5 $\mu\text{g/ml}$, als auch mit 25 $\mu\text{g/ml}$ ein deutliches braunes Signal erkennbar (Abb. 13). An den 3-D-HTA-Aldehyd-OT mit 12 Kavitäten wurde der Versuch mit einer Konzentrationsreihe mit 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 und 0 $\mu\text{g/ml}$ TGF- β_1 durchgeführt. Dabei war eine deutliche Korrelation zwischen der TGF- β_1 -Konzentration und dem Grad der Braunfärbung zu sehen (Abb.



Abb. 13: LSAB-Test auf beschichtetem 3-D-HTA-Aldehyd-OT ($c_{\text{TGF-}\beta_1} = 5 \mu\text{g/ml}$)

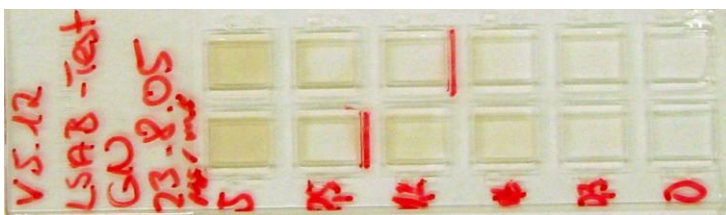


Abb. 14: LSAB-Test auf beschichtetem 3-D-HTA-Aldehyd-OT mit 12 Kavitäten mit verschiedenen TGF- β_1 -Konzentrationen ($c_{\text{TGF-}\beta_1} = 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31$ und $0 \mu\text{g/ml}$).

Sowohl bei SuperAldehyd-OT (Abb. 16) als auch bei SuperEpoxy-OT war ein deutliches Signal nur bei 25 µg/ml zu erkennen, wobei das Signal bei SuperEpoxy insgesamt schwächer war. Schwache Signale ($c = 5$ µg/ml) sind leider nur am Original zu erkennen, nicht auf den Bildern (Abb. 15). Die Immobilisierung an SuperEpoxy-OT wurde mit Kopplungslösungen verschiedener pH Werte durchgeführt. Dabei war kein Unterschied im Grad der Braunfärbung erkennbar (Abb. 17, 18, 19).



Abb. 15: LSAB-Test auf beschichtetem SuperAldehyd-OT ($c_{\text{TGF-}\beta 1} = 5$ µg/ml), schwaches Signal nur im Original erkennbar.

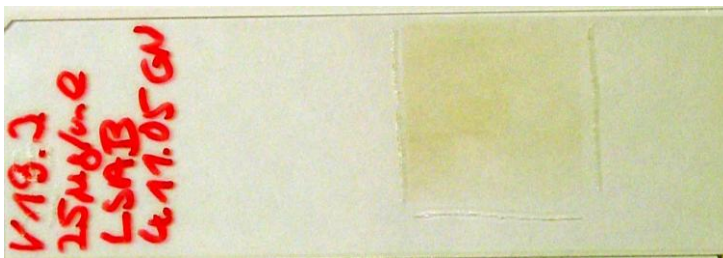


Abb. 16: LSAB-Test auf beschichtetem SuperAldehyd-OT ($c_{\text{TGF-}\beta 1} = 25$ µg/ml).

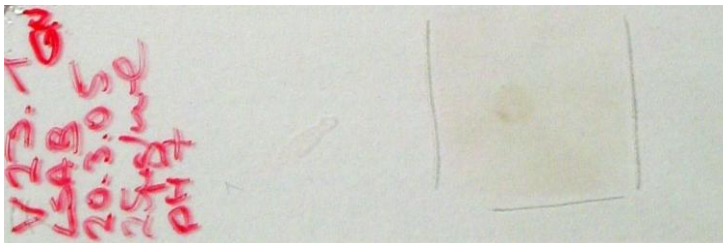


Abb. 17: LSAB-Test auf beschichtetem SuperEpoxy-OT ($c_{\text{TGF-}\beta 1} = 25$ µg/ml) bei pH-Wert der Beschichtungslösung von 7.

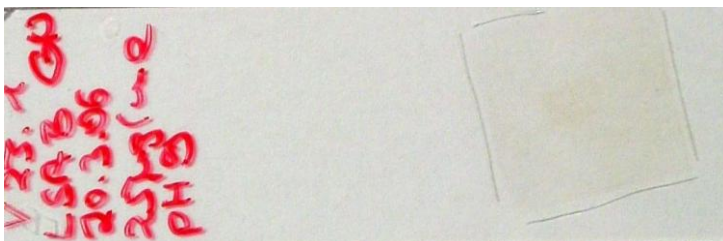


Abb. 18: LSAB-Test auf beschichtetem SuperEpoxy-OT ($c_{\text{TGF-}\beta 1} = 25$ µg/ml) bei pH-Wert der Beschichtungslösung von 9.

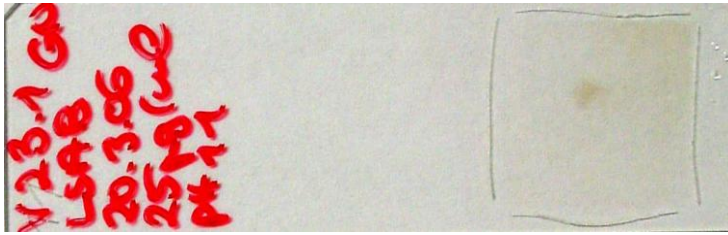


Abb. 19: LSAB-Test auf beschichtetem SuperEpoxy-OT ($c_{\text{TGF-}\beta_1} = 25 \text{ }\mu\text{g/ml}$) bei pH-Wert der Beschichtungslösung von 11.

An den aminosilanisierten OT gelang es weder mit einer Konzentration von $5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ noch mit einer Konzentration von $25 \text{ }\mu\text{g/ml}$ TGF- β_1 , ein sichtbares Signal zu erlangen (ohne Abb.).

4.2. Immobilisierung von IGF II

Da mit TGF- β_1 auf aminosilanisierten OT bis zu einer Konzentration von $c = 25 \text{ }\mu\text{g/ml}$ kein sichtbares Signal im LSAB-Test zu erreichen war und eine höhere Konzentration von TGF- β_1 nicht verfügbar war, wurde als weiteres Protein IGF II verwendet, welches in einer Konzentration von $c = 50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ vorlag. Außerdem soll gezeigt werden, dass die Immobilisierung auch mit anderen Proteinen universell einsetzbar ist. Die Immobilisierung von IGF II wurde mit aminosilanisierten OT und SuperAldehyd-OT durchgeführt. Hierbei war bei aminosilanisierten OT ein deutliches Signal zu erkennen (Abb. 20) bei SuperAldehyd-OT ein schwächeres (ohne Abb.). Das Signal war auch im Vergleich zu mit TGF- β_1 beschichteten SuperAldehyd-OT schwächer.



Abb. 20: LSAB-Test auf beschichtetem aminosilanisierten OT ($c_{\text{IGF II}} = 50 \text{ }\mu\text{g/ml}$).

Tabelle 6 fasst zusammen, bei welchen Substraten der Nachweis der Immobilisierung gelungen ist. Da mit dem LSAB-Kit der Nachweis nicht nur qualitativ ist, sondern auch semiquantitativ möglich ist, wird auch ein Überblick über die Intensität der jeweiligen Signale gegeben.

Tab. 6: Zusammenfassung des Grades der Braunfärbung im LSAB-Test von verschiedenen Substraten und Proteinen bei unterschiedlichen Konzentrationen (+++ = sehr stark, ++ = stark, + = schwach, - = nicht sichtbar, % = nicht durchgeführt)

		Protein, Konzentration		
		TGF- β_1 , 5 $\mu\text{g/ml}$	TGF- β_1 , 25 $\mu\text{g/ml}$	IGF II, 50 $\mu\text{g/ml}$
Substrat	3-D-HTA-Aldehyd	+++	+++	%
	Super-Aldehyd	+	++	+
	SuperEpoxy	+	++	%
	Aminosilan	-	-	+++

4.3. Desorption von immobilisiertem TGF- β_1

Um eine eventuelle Desorption von immobilisiertem TGF- β_1 von den funktionalisierten Oberflächen zu überprüfen, wurde in Ergänzung zur on-slide-Kontrolle, exemplarisch ein Versuch mit beschichteten SuperAldehyd-OT durchgeführt. Dazu wurde mittels ELISA der Gehalt von aktivem und latentem TGF- β_1 in Q333 vor, während und nach der Inkubation mit dem beschichteten OT und einem unbeschichteten OT als Kontrolle bestimmt. In jeder der Proben lag die Konzentration der aktiven Form des TGF- β_1 unter der Nachweisgrenze. Die Konzentration der latenten Form des TGF- β_1 nahm sowohl im Mediumüberstand der Kontrolle, als auch im Mediumüberstand der beschichteten OT ab (Abb. 21).

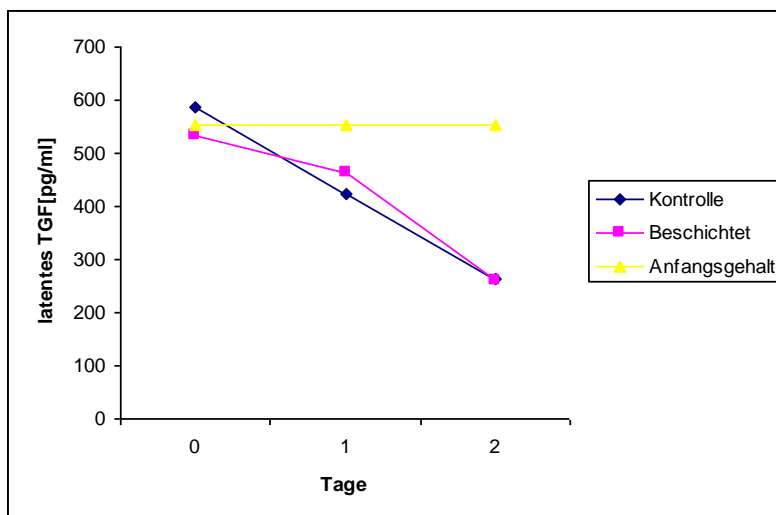


Abb. 21: Konzentration an latentem TGF- β_1 in pg/ml Q333 nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer mit beschichteten OT ($c_{\text{TGF-}\beta_1} = 5 \mu\text{g/ml}$) und unbeschichteter Kontrolle.

4.4. Induktion der Differenzierung von NHDF zu MF mit löslichem TGF- β_1

Das Ziel dieses Versuches war es, zu zeigen, dass die Differenzierung von NHDF zu MF durch TGF- β_1 in löslicher Form induziert werden kann. Des Weiteren sollte die dazu notwendige, minimale Konzentration von TGF- β_1 ermittelt werden. Dazu wurden NHDF mit TGF- β_1 inkubiert ($d = 4$ Tage, $c_{\text{TGF-}\beta_1} = 0,1 \text{ ng/ml}$ ($n = 5$), 1 ng/ml ($n = 8$), 5 ng/ml ($n = 8$) und 25 ng/ml ($n = 3$)). Dabei wurde ohne TGF- β_1 ($n = 8$) eine durchschnittliche Differenzierungsrate von $15,1 \pm 5,0\%$ erreicht, mit $0,1 \text{ ng/ml}$ TGF- β_1 $18,2 \pm 3,0\%$, mit 1 ng/ml TGF- β_1 $35,6 \pm 9\%$, mit 5 ng/ml TGF- β_1 $32,2 \pm 8,4\%$ und mit 25 ng/ml TGF- β_1 $38,3 \pm 12,5\%$ (Abb. 22). Eine signifikante Steigerung der MF-

Differenzierungsrate wurde ab einer TGF- β_1 -Konzentration von 1 ng/ml festgestellt ($p = 0,002$). Darüber hinaus war keine weitere signifikante Steigerung der MF-Differenzierungsrate möglich (Tab. 7).

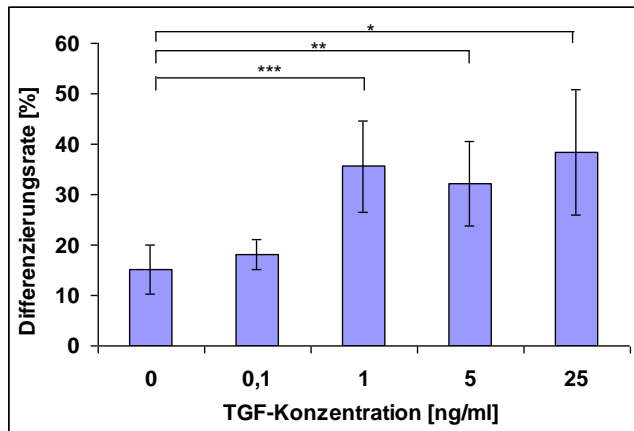


Abb. 22: Mittelwerte der Differenzierungsraten [%] zu MF mit löslichem TGF- β_1 als Induktor (d = 4 Tage, $c_{\text{TGF-}\beta_1} = 0,1$ ng/ml (n = 5), 1 ng/ml (n = 8), 5 ng/ml (n = 8) und 25 ng/ml (n = 3), * $p = 0,001$, ** $p = 0,001$, *** $p = 0,002$).

Tab. 7: Zusammenfassung der MF-Differenzierungsraten in Abhängigkeit zur TGF- β_1 -Konzentration im Medium

$c_{\text{TGF-}\beta_1}$	Differenzierungsrate	n	$ \Delta $	p	Signifikanz
0 (Kontrolle)	15,1 ± 5,0%	8	-	-	-
0,1	18,2 ± 3,0%	5	3,1	0,917	nein
1	35,6 ± 9%	8	20,5	0,002	ja
5	32,2 ± 8,4%	8	17,1	0,001	ja
25	38,3 ± 12,5%	3	23,2	0,001	ja

4.5. Induktion der Differenzierung von NHDF zu Myofibroblasten mit immobilisiertem TGF- β_1

4.5.1. 3-D-HTA-Aldehyd-Objektträger

In Zellkulturversuchen mit NHDF auf 3-D-HTA-Aldehyd-OT konnte eine signifikante Steigerung der Differenzierungsrate auf dem beschichteten Areal im Vergleich zum unbeschichteten Areal um 6,4% beobachtet werden ($p = 0,002$). Im Vergleich zur Grunddifferenzierungsrate der Glaskontrolle war keine signifikante Steigerung zu beobachten ($p = 0,863$). Stellt man den unbeschichteten Bereich und die Kontrolle auf Glas gegenüber, so war die Differenzierungsrate der MF auf den 3-D-HTA-

Aldehyd-OT geringer, was jedoch nicht statistisch signifikant war ($p = 0,234$) (Abb. 23).

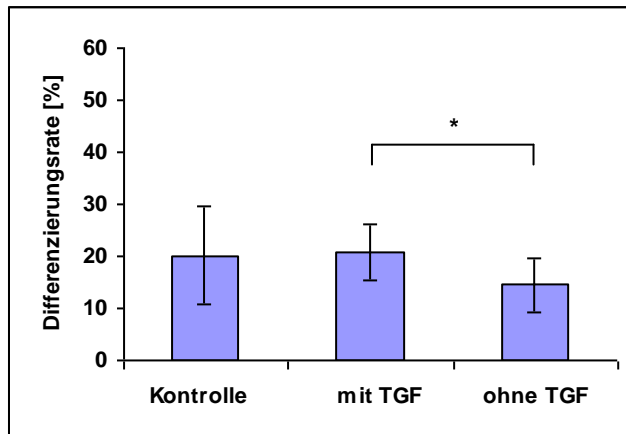


Abb. 23: Mittelwerte der Differenzierungsrate auf 3-D-HTA-Aldehyd-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 6$, $d = 3$ Tage, $p^* = 0,002$) und auf der Glaskontrolle.

Die Zelldichte betrug bei der Kontrolle auf Glas 19 Zellen je Gesichtsfeld, auf den Bereichen mit TGF- β_1 21 Zellen und ohne TGF- β_1 23 Zellen (Abb. 24).

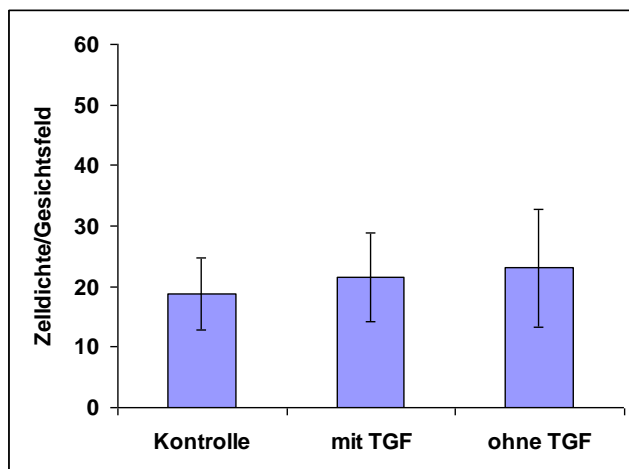


Abb. 24: Mittelwerte der Zelldichte auf 3-D-HTA-Aldehyd-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 6$ Tage, $d = 3$) und auf der Glaskontrolle.

Die Anzahl der Mitosen betrug bei der Kontrolle auf Glas 19‰, mit TGF- β_1 15‰ und ohne TGF- β_1 21‰ (Abb. 25).

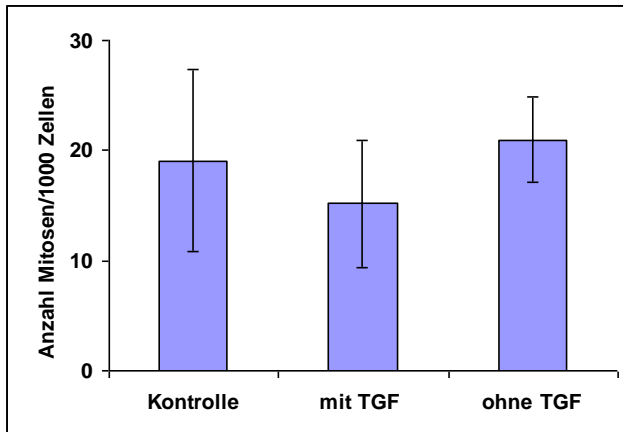


Abb. 25: Mittelwerte der Anzahl der Mitosen/1000 Zellen auf Glaskontrolle und 3-D-HTA-Aldehyd-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 6$, $d = 3$ Tage).

4.5.2. SuperAldehyd-Objektträger

Die zweiten untersuchten aldehydfunktionalisierten Oberflächen waren SuperAldehyd-OT. Hier war eine signifikante Steigerung der Differenzierungsrate um 9,4% vom beschichteten zum unbeschichteten Teil des Objektträgers zu sehen ($p = 0,004$). Auch im Vergleich zur Kontrolle auf Glas lag eine signifikante Steigerung der Differenzierungsrate um 9,5% ($p = 0,028$) vor. Vergleicht man hier die Kontrolle auf Glas mit dem unbeschichteten Bereich, so gibt es mit einer Differenzierungsrate von 28,8 bzw. 28,7% keinen Unterschied ($p = 0,973$) (Abb. 26).

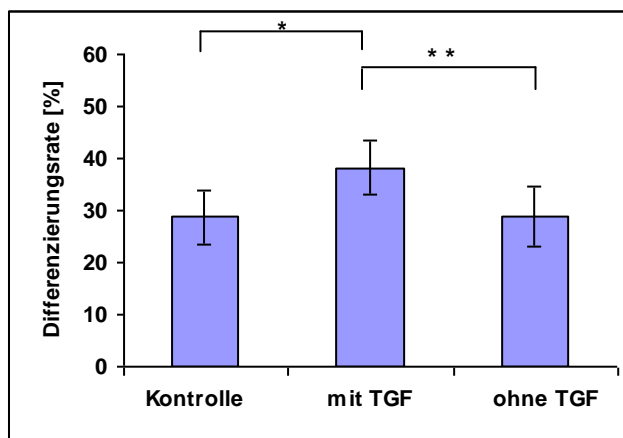


Abb. 26: Mittelwerte der Differenzierungsrate auf SuperAldehyd-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 5$, $d = 3$ Tage, $p^* = 0,028$, $p^{**} = 0,004$) und auf der Glaskontrolle.

Die mittlere Zelldichte betrug bei der Kontrolle auf Glas 12 Zellen, mit TGF- β_1 15 Zellen und ohne TGF- β_1 13 Zellen je Gesichtsfeld (Abb. 27).

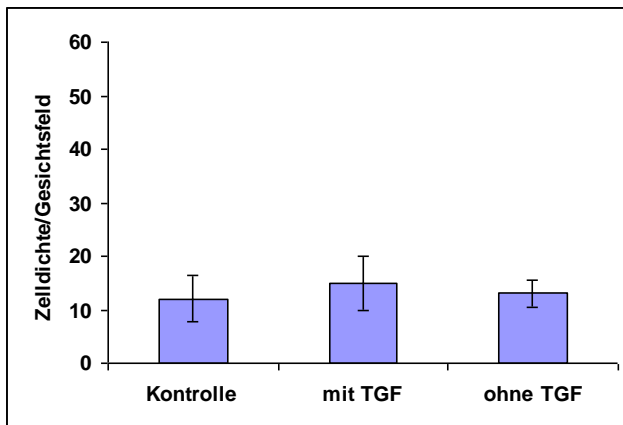


Abb. 27: Mittelwerte der Zelldichte auf SuperAldehyd-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 5$, $d = 3$ Tage) und auf der Glaskontrolle.

Die Anzahl der Mitosen betrug bei der Kontrolle auf Glas 7‰, mit TGF- β_1 14‰ und ohne TGF- β_1 8‰ (Abb. 28).

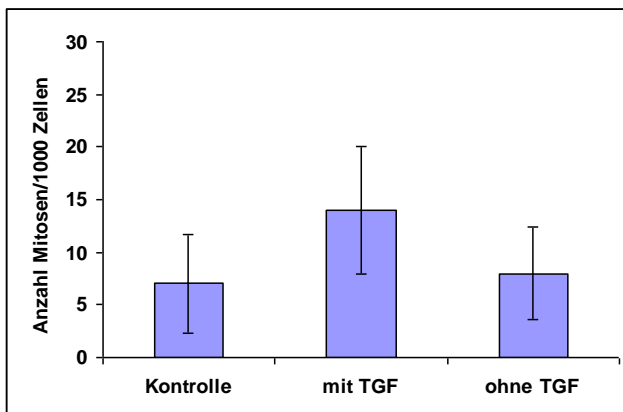


Abb. 28: Mittelwerte der Anzahl der Mitosen/1000 Zellen auf SuperAldehyd-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 5$, $d = 3$ Tage) und auf der Glaskontrolle.

4.5.3. SuperEpoxy-Objektträger

Die Differenzierungsrate auf dem beschichteten Bereich der SuperEpoxy-OT lag mit 29,1% deutlich höher als die Differenzierungsrate auf dem unbeschichteten Bereich, die bei 23,7% lag. Mit $p = 0,025$ zeigte dieser Unterschied statistische Signifikanz.

Im Vergleich zur Kontrolle auf Glas war keine Steigerung zu sehen ($p = 0,807$). Auch hier lag, wie bei den 3-D-HTA-Aldehyd-OT, die Differenzierungsrate des unbeschichteten Bereichs unter der Differenzierungsrate der Kontrolle auf Glas (28,6%, $p = 0,090$) (Abb. 29).

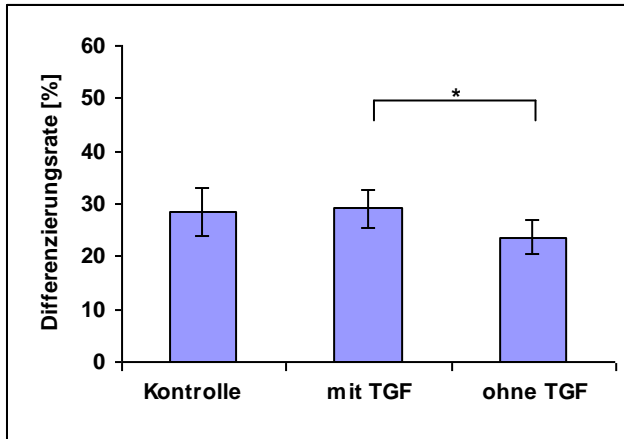


Abb. 29: Mittelwerte der Differenzierungsrate auf SuperEpoxy-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 6$, $d = 3$ Tage, $p^* = 0,025$) und auf der Glaskontrolle.

Die mittlere Zelldichte je Gesichtsfeld betrug bei der Kontrolle auf Glas 15 Zellen, mit TGF- β_1 15 Zellen und ohne TGF- β_1 24 Zellen (Abb. 30).

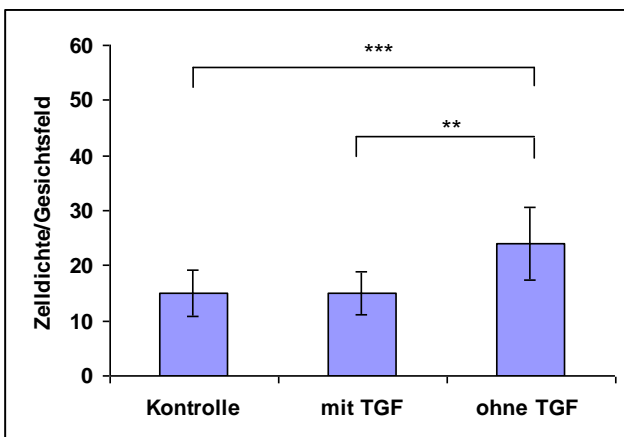


Abb. 30: Mittelwerte der Zelldichte je Gesichtsfeld auf SuperEpoxy-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 6$, $d = 3$ Tage, $p^{**} = 0,028$, $p^{***} = 0,031$) und auf der Glaskontrolle.

Die Anzahl der Mitosen betrug bei der Kontrolle auf Glas 8‰, mit TGF- β_1 7‰ und ohne TGF- β_1 8‰ (Abb. 31).

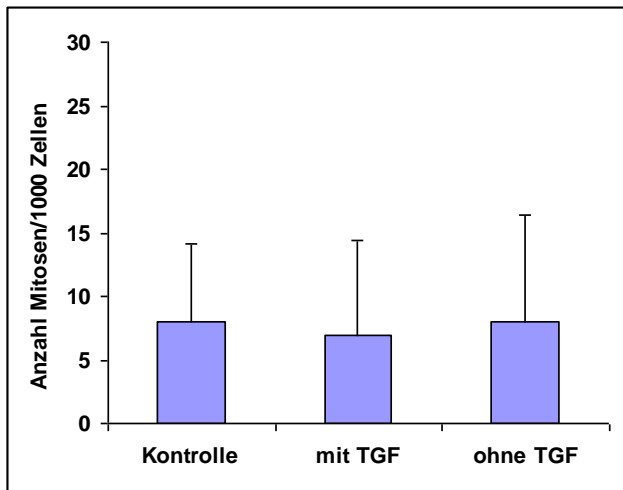


Abb. 31: Mittelwerte der Anzahl der Mitosen/1000 Zellen auf SuperEpoxy-OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 6$, $d = 3$ Tage) und auf der Glaskontrolle.

4.5.4. Aminosilanisierte Objektträger

Ganz unterschiedlich zu den vorher gezeigten Ergebnissen fielen die Ergebnisse der Versuche auf den aminosilanisierten OT aus. Die Differenzierungsrate des beschichteten Bereichs lag 9,2% unter der des unbeschichteten Bereichs ($p = 0,032$) und 12,2% unter der Kontrolle auf Glas ($p = 0,014$). Die Differenzierungsraten der Kontrolle auf Glas und des unbeschichteten Bereichs unterschieden sich nicht ($p = 0,498$) (Abb. 32).

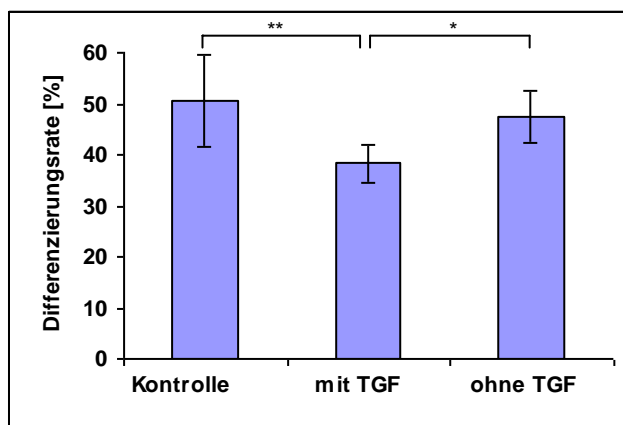


Abb. 32: Mittelwerte der Differenzierungsrate auf aminosilanisierten OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 5$, $d = 3$ Tage, $p^* = 0,032$, $p^{**} = 0,014$) und auf der Glaskontrolle.

Die mittlere Zelldichte betrug bei der Kontrolle auf Glas 13 Zellen je Gesichtsfeld, mit TGF- β_1 13 Zellen und ohne TGF- β_1 24 Zellen (Abb. 33).

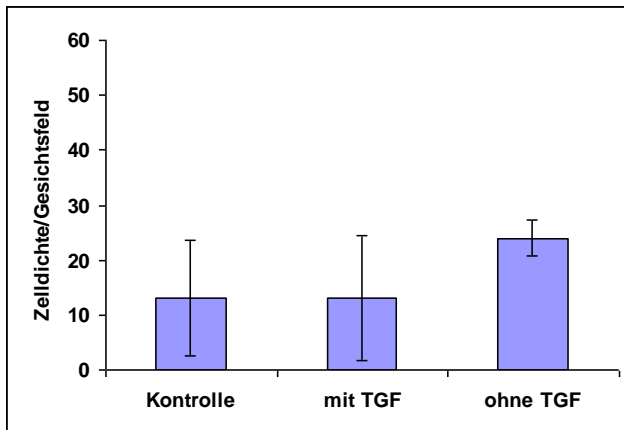


Abb. 33: Mittelwerte der Zelldichte je Gesichtsfeld auf aminosilanisierten OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 5$, $d = 3$ Tage) und auf der Glaskontrolle.

Die Anzahl der Mitosen betrug bei der Kontrolle auf Glas 11‰, mit TGF- β_1 10‰ und ohne TGF- β_1 11‰ (Abb. 34).

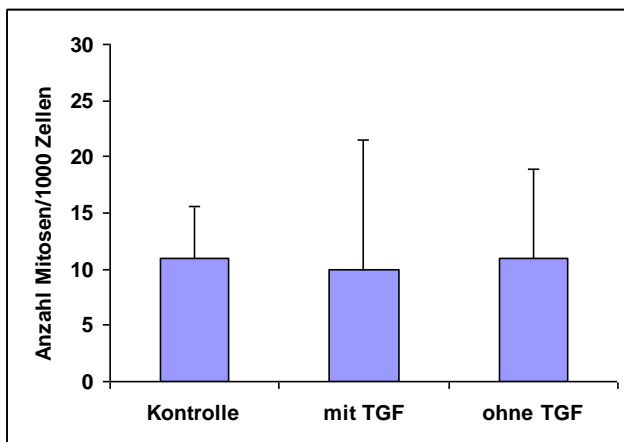


Abb. 34: Mittelwerte der Anzahl der Mitosen/1000 Zellen auf aminosilanisierten OT mit und ohne TGF- β_1 -Beschichtung ($c = 5 \mu\text{g/ml}$, $n = 5$, $d = 3$ Tage) und auf der Glaskontrolle.

Die Tabellen 8, 9 und 10 fassen die oben gezeigten Ergebnisse zusammen.

Tab. 8: Differenzierungsrate (Mittelwerte und Standardabweichungen) von NHDF auf unterschiedlichen Oberflächen im Vergleich. Signifikante Unterschiede sind fett dargestellt.

Substrat	Differenzierungsrate [%]				n	p < 0,05
	Glas-Kontrolle	ohne TGF- β_1	mit TGF- β_1	$ \Delta $		
3-D-HTA-Aldehyd-OT	20,0 \pm 9,4	14,4 \pm 5,4		5,6	6	nein
	20,0 \pm 9,4		20,8 \pm 5,4	0,8		nein
		14,4 \pm 5,4	20,8 \pm 5,4	6,4		ja
SuperAldehyd-OT	28,7 \pm 5,1	28,8 \pm 5,7		0,1	5	nein
	28,7 \pm 5,1		38,2 \pm 5,2	9,5		ja
		28,8 \pm 5,7	38,2 \pm 5,2	9,4		ja
SuperEpoxy-OT	28,6 \pm 4,6	23,7 \pm 3,2		4,9	6	nein
	28,6 \pm 4,6		29,1 \pm 3,6	0,5		nein
		23,7 \pm 3,2	29,1 \pm 3,6	5,4		ja
Aminosilanisierte OT	50,6 \pm 8,9	47,6 \pm 5,1		3,0	5	nein
	50,6 \pm 8,9		38,4 \pm 3,7	12,2		ja
		47,6 \pm 5,1	38,4 \pm 3,7	9,2		ja

Tab. 9: Zellzahlen/Gesichtsfeld (Mittelwerte und Standardabweichungen) von NHDF auf unterschiedlichen Oberflächen im Vergleich. Signifikante Unterschiede sind fett dargestellt.

Substrat	Zellzahl/Gesichtsfeld				n	p
	Glas-kontrolle	ohne TGF- β_1	mit TGF- β_1	$ \Delta $		
3-D-HTA-Aldehyd-OT	19,0 \pm 6,0	23,0 \pm 10		4,0	6	0,434
	19,0 \pm 6,0		21,0 \pm 7,0	2,0		0,451
		23,0 \pm 10	21,0 \pm 7,0	2,0		0,662
SuperAldehyd-OT	12,0 \pm 4,0	13,3 \pm 3,0		1,3	5	0,999
	12,0 \pm 4,0		15,0 \pm 5,0	3,0		0,379
		13,3 \pm 3,0	15,0 \pm 5,0	1,7		0,204
SuperEpoxy-OT	15,0 \pm 4,0	24,0 \pm 7,0		9,0	6	0,031
	15,0 \pm 4,0		15,0 \pm 4,0	0,0		0,616
		24,0 \pm 7,0	15,0 \pm 4,0	9,0		0,028
Aminosilanisiert-OT	13,0 \pm 10,0	24,0 \pm 3,0		11,0	5	0,162
	13,0 \pm 10,0		13,0 \pm 11,0	0,0		0,946
		24,0 \pm 3,0	13,0 \pm 11,0	11,0		0,197

Tab. 10: Mitoseraten (Mittelwerte und Standardabweichungen) von NHDF auf unterschiedlichen Oberflächen im Vergleich.

Substrat	Mitoseraterate [‰]				n	p
	Glas-Kontrolle	ohne TGF- β_1	mit TGF- β_1	$ \Delta $		
3-D-HTA-Aldehyd	19,0 \pm 8,0	21,0 \pm 3,9		2,0	6	0,988
	19,0 \pm 8,0		15,0 \pm 5,8	4,0		0,568
		21,0 \pm 3,9	15,0 \pm 5,8	6,0		0,252
SuperAldehyd	7,0 \pm 4,7	8,0 \pm 4,5		1,0	5	0,848
	7,0 \pm 4,7		14,6 \pm 6,0	7,6		0,101
		8,0 \pm 4,5	14,6 \pm 6,0	6,6		0,177
SuperEpoxy	8,0 \pm 6,2	8,0 \pm 8,4		0,0	6	0,987
	8,0 \pm 6,2		7,0 \pm 7,5	1,0		0,893
		8,0 \pm 8,4	7,0 \pm 7,5	1,0		0,908
Amino-silanisiert via GDA	11,0 \pm 4,6	11,0 \pm 7,9		0,0	5	0,912
	11,0 \pm 4,6		10,0 \pm 11,4	1,0		0,679
		11,0 \pm 7,9	10,0 \pm 11,4	1,0		0,926

4.6. Einfluß der Zelldichte der Vorkultur auf die myofibroblastoide Differenzierungsrate

Dieser Versuch wurde durchgeführt, da die Differenzierungsraten der Kontrollen stark schwankten und bekannt ist, dass die myofibroblastoide Differenzierungsrate von der Aussaatdichte abhängt. Die Dichte der Vorkultur wurde als möglicher Einflussfaktor auf die Differenzierungsrate untersucht. Die unterschiedlich dicht ausgesäten Zellen wurden im Brutschrank inkubiert bis die erste Flasche konfluent bewachsen war (3 Tage), bevor die Zellzahl der Kulturen bestimmt wurde. Es wurden Zelldichten von 6, 12, 34 und 48 x 10⁴ Zellen/ml bestimmt. Bei den daraus mit gleicher Dichte (15 Zellen/mm²) angesetzten OT war die Differenzierungsrate umso höher, je geringer die Zelldichte der Vorkultur war (Abb. 35).

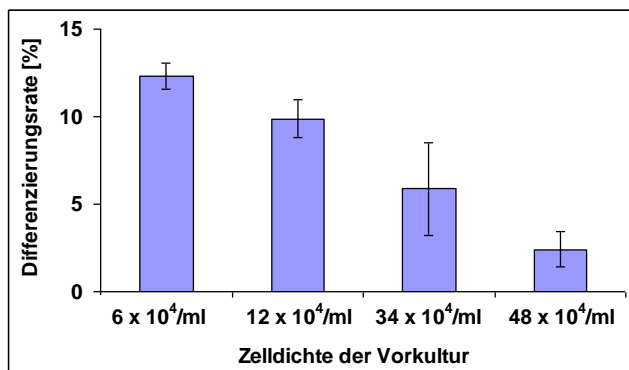


Abb. 35: Differenzierungsrate von NHDF in Abhängigkeit zur Zelldichte der Vorkultur (n = 2, d = 5).

5. Diskussion

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu zeigen, ob die kovalente Kopplung von TGF- β_1 an verschiedene Oberflächen möglich ist und ob diese Oberflächen in der Lage sind, die MF-Differenzierung im Zellkulturversuch zu induzieren. Außerdem wurden Zellkulturversuche mit löslichem TGF- β_1 und unbehandelten Glas-OT durchgeführt, um zu zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist, die Differenzierung von NHDF zu MF mit TGF- β_1 zu induzieren. Zur Bestätigung wurden Zellkulturversuche mit an verschiedene Oberflächen gekoppeltem TGF- β_1 durchgeführt.

NHDF als Modellzelle

Die Fähigkeit von Fibroblasten, in vivo zu MF zu differenzieren, ist seit langem bekannt. Als Auslöser der MF-Differenzierung werden sowohl TGF- β_1 -Stimulation (Moulin V. et al. 1998; Martin P. 1997; Diegelmann RF. und Evans MC. 2004), als auch die Änderung der mechanischen Gewebespannung während der Wundheilung (Hinz B. et al. 2001) diskutiert. In vitro kann eine geringe Zelldichte ursächlich für eine MF-Differenzierung sein (Masur SK. et al. 1996).

Es wurden außerdem viele Studien über die Induktion der MF-Differenzierung in vitro durch lösliches TGF- β_1 veröffentlicht (Desmoulière A. et al 1993, Ronnov-Jessen L. und Peterson OW. 1993). Dabei wurde mit Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft gearbeitet. Sowohl menschliche Fibroblasten aus Dupuytren-Knoten (Serini G. et al 1998), Rattenfibroblasten unterschiedlicher Herkunft (Hinz B. et al 2004) als auch Fibroblasten von Kaninchen (Masur SK. et al 1996) wurden verwendet. Wir arbeiteten mit menschlichen NHDF, die aus der Vorhaut isoliert wurden. Um zu überprüfen, ob mit diesen NHDF die Differenzierung zu MF möglich ist, wurden Zellkulturversuche mit löslichem TGF- β_1 durchgeführt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass im Zellkulturversuch eine signifikante Steigerung der MF-Differenzierungsrate durch Zugabe von löslichem TGF- β_1 reproduzierbar möglich ist. Somit konnten wir zeigen, dass unsere NHDF als Modellzelle für die Versuche mit beschichteten Oberflächen, die TGF- β_1 präsentieren, geeignet sind.

In unseren Experimenten zeigte sich ein genereller Einfluss der Zelldichte auf die Differenzierungsrate. Auf Glas-OT, die als Kontrolle in allen Experimenten mit TGF- β_1 beschichteten Oberflächen mitgeführt wurden, fanden wir unter Beibehaltung möglichst unveränderter Zellkulturbedingungen eine myofibroblastoide Grund-Differenzierungsrate von $27,8 \pm 13,9\%$. Moulin et al (1998) beschrieben eine Grund-Differenzierungsrate von nur $10,1 \pm 5,6\%$ für unbehandelte humane dermale Fibroblasten. Bei allen Zellkulturversuchen wurden die OT mit einer Zelldichte von $63/\text{mm}^2$ angeimpft. Moulin et al (1998) säten $40 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$ als Anfangszelldichte aus. Diese unterschiedliche Anfangszelldichte kann für den Unterschied im Ergebnis nicht verantwortlich sein, weil zu erwarten wäre, dass eine niedrigere Aussaatdichte eher zu einer höheren MF-Differenzierung führen würde (Masur SK. et al 1996).

Bei Vorversuchen (nicht dargestellt) mit einer geringeren Anfangszelldichte und längerer Inkubationszeit waren die OT am Ende der Versuchszeit so dicht bewachsen, dass bei der mikroskopischen Auswertung keine sichere Zuordnung von α -SMA zu Zellkern mehr möglich war und somit auch die Differenzierungsrate nicht exakt ermittelt werden konnte, deshalb wurde für die, in dieser Arbeit beschriebenen Versuche, eine höhere Anfangszelldichte und eine kürzere Inkubationszeit gewählt.

Im weiteren konnte beobachtet werden, dass der Einfluss unterschiedlicher Zelldichten sogar nach Passagieren der Zellen erhalten bleibt (wie Abb. 35 zeigt). Deshalb könnte die Zelldichte vorangegangener Kulturen auch relevant für Kryokulturen sein. Für zukünftige Experimente genügt es nicht, das Zellkultursetup selbst zu standardisieren, es ist auch nötig, die Behandlung der Vorkultur und der Cryokulturen zu standardisieren (zum Beispiel Masterzellbank), um die Abweichung der Basis-Differenzierungsrate zu minimieren. Ein weiterer Faktor, der verantwortlich für die unterschiedlichen Differenzierungsraten sein könnte, sind die unterschiedlichen Materialien, die für die Zellkultur (Glas-OT gegen Plastik-OT) verwendet wurden.

Die Induktion der Differenzierung mittels TGF- β_1 wurde in der Literatur mehrfach beschrieben. Die effektivste Konzentration von löslichem TGF- β_1 , mit der die Induktion der MF-Differenzierung möglich ist, sollte ermittelt werden. Dazu wurden Zellkulturversuche mit unterschiedlichen TGF- β_1 -Konzentrationen durchgeführt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung von NHDF zu MF mit einer Konzentration ab 1 ng/ml TGF- β_1 möglich ist. Jede weitere Dosissteigerung führte zu einer signifikant höheren Differenzierungsrate im Vergleich zur Kontrolle, nicht jedoch im Vergleich zu 1 ng/ml. Damit bestätigten wir zum einen die minimale wirksame Konzentration, die Desmouliere et al. (1993) in ihren Experimenten an menschlichem subkutanen Fibroblasten fanden. Die von uns ermittelte Konzentration entspricht aber zum anderen nur einem Fünftel der Konzentration, die von Hinz et al. (2004) im Rattenmodell (in vitro) benutzt wurde, um die MF-Differenzierung zu induzieren.

Differenzierung auf Oberflächen

TGF- β_1 wurde kovalent an verschiedene funktionalisierte Oberflächen immobilisiert. Dazu wurden verschiedene OT benutzt. Aldehyd-funktionalisierte OT (3-D-HTA-Aldehyd-OT und SuperAldehyd OT), epoxyfunktionalisierte OT (SuperEpoxy OT) und aminosilanisierte OT. An diese wurde TGF- β_1 mit einer Konzentration der Beschichtungslösung von 5 μ g/ml immobilisiert.

Um die Aktivität des immobilisierten Wachstumsfaktors nachzuweisen, wurde die Fähigkeit der beschichteten OT überprüft, in nachfolgenden Zellkulturexperimenten eine Steigerung der MF-Differenzierungsrate hervorzurufen. Als Kontrolle wurden unbeschichtete Glas-OT mitgeführt.

Bei der Immobilisierung an aldehydfunktionalisierte und epoxyfunktionalisierte OT wurde TGF- β_1 direkt auf den OT aufgetragen. TGF- β_1 kann sowohl mit den Aldehyd-, als auch mit den Epoxygruppen direkt reagieren. Bei den aminosilanisierten OT ist ein Spacer nötig, da TGF- β_1 nicht direkt mit den Aminogruppen reagieren kann. Der Spacer kann zur Kopplung in einem Ein-Schritt-Verfahren zusammen mit dem Protein eingesetzt werden. In diesem einfachen Ansatz reagieren Spacer und Protein im selben Inkubationsschritt statistisch miteinander. Es ist hierbei zu beachten, dass bei homobifunktionellen längeren Spacern neben der gewünschten Proteinkopplung auch eine autologe Bindung beider funktioneller Gruppen des einzelnen

Spacermoleküls mit der modifizierten Materialoberfläche beziehungsweise mit dem Protein erfolgen kann (Crosslinking des Proteins ohne Oberflächenbindung). Diese Leerkopplungen mindern die Effizienz des Bindungsansatzes. Das alternative Zwei-Schritt-Verfahren sieht vor, zunächst nur den Spacer über eine funktionelle Gruppe zu binden, wobei die zweite Gruppe des Spacers unverändert bleiben muss und eventuell in diesem Schritt geschützt werden muss. Erst im zweiten Schritt wird das Protein hinzugefügt, welches dann mit der verbliebenen funktionellen Gruppe des Spacers reagieren soll. Die Zwei-Schritt-Methode ist aufwendiger, jedoch theoretisch effizienter, weshalb von uns die Immobilisierung von TGF- β_1 an aminosilanisierte OT in der Zwei-Schritt-Methode durchgeführt wurde.

Wir überprüften den Erfolg unserer Kopplung mit einem LSAB-Kit. Der LSAB-Test ist ein einfach durchzuführender Test, der in unserem Fall semiquantitativ TGF- β_1 nachweist. Der LSAB-Test kann allerdings nicht zwischen kovalent gebundenem TGF- β_1 und adsorbiertem TGF- β_1 unterscheiden, sondern macht nur eine Aussage darüber ob TGF- β_1 vorhanden ist oder nicht. Wir stellten klare Unterschiede in der Effizienz der Kopplung fest. Obwohl das Kopplungsprotokoll sowohl für die 3-D-HTA-Aldehyd-OT als auch für die SuperAldehyd-OT gleich war, variierte die Intensität des Signals im LSAB-Test deutlich. Mit 3-D-HTA-Aldehyd-OT war ein starkes Signal zu erkennen, mit SuperAldehyd-OT dagegen nur ein schwaches Signal.

Es ist möglich, dass diese Abweichung wegen der unterschiedlichen Dichte der reaktiven Gruppen auf den OT zustande kam. Diese beträgt $5 \times 10^{12}/\text{mm}^2$ bei den SuperAldehyd-OT und mindestens $9,1 \times 10^{12}/\text{mm}^2$ bei den 3-D-HTA-Aldehyd-OT.

Auch die Lokalisierung der Aldehydgruppen auf den 3-D-HTA-Aldehyd-OT könnte von Bedeutung sein. Diese besitzen eine dreidimensionale Matrix mit einer Höhe von bis zu 50 nm, was für eine bessere Erkennung des TGF- β_1 im LSAB-Test verantwortlich sein könnte.

Der Nachweis von immobilisiertem TGF- β_1 auf den SuperEpoxy-OT war nur mit einer Konzentration der Beschichtungslösung von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ möglich.

An aminosilanisierten OT erhielten wir kein Signal für die GDA-vermittelte Immobilisierung von TGF- β_1 , weder mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ noch mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Konzentration an gekoppeltem TGF- β_1 war möglicherweise zu niedrig und lag unter der Nachweisgrenze.

Weil TGF- β_1 nicht in höherer Dosierung verfügbar war, benutzen wir IGF-II in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Hier erhielten wir ein sehr starkes und gut definiertes Signal im LSAB-Test. Somit konnten wir zeigen, dass die Immobilisierung auf gleiche Weise auch mit anderen Proteinen möglich ist.

Ohne die Ergebnisse der LSAB-Tests mit den beschichteten OT zu berücksichtigen wurden alle in Zellkultur benutzten OT mit einer TGF- β_1 Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ beschichtet.

Die Stabilität der Kopplung von Proteinen an Oberflächen ist vor allem in vivo von großer Bedeutung. Alle bisherigen Studien bezüglich Immobilisierung von TGF- β_1 basieren auf physikalischer Adsorption, die wegen des hydrophoben Charakters des Proteins sehr stark ist. Es wurde gezeigt, dass TGF- β_1 seine Funktion gegenüber Osteoblasten und glatten Muskelzellen nach Adsorption an Titan und Titanlegierungen beibehält (Mann BK. et al 2001, Fischer U. et al 2003, Vehof JW. et al 2002). Der große Nachteil passiver Adsorption ist, dass unkontrollierte Desorption stattfinden kann, besonders in vivo und unter saurem pH Bedingungen (Werz O. et al 1996). Vehof et al. (2002) zeigten, dass sich in vivo fast 80% von der anfänglichen TGF- β_1 Dosis von Titanfaser-Maschenimplantaten ablöste.

Um die Desorption von TGF- β_1 nach der Immobilisierung zu überprüfen, untersuchten wir exemplarisch, stellvertretend für alle OT, die Mediumüberstände der SuperAldehyd-OT mittels ELISA. Dazu wurde der Gehalt sowohl an latentem als auch an aktivem TGF- β_1 im Mediumüberstand von beschichteten OT bestimmt. Insgesamt wurden 250 ng aktives TGF- β_1 in diesem Experiment immobilisiert. Bei Annahme einer kompletten Desorption würde sich eine hypothetische Konzentration von 63 ng/ml aktivem TGF- β_1 im Medium ergeben. Der Anfangsgehalt an latentem TGF- β_1 im Medium Q333 betrug 553 pg/ml. Nach 1 und 2 Tagen Inkubation sowohl auf beschichteten als auch unbeschichteten OT war der Gehalt an latentem TGF- β_1 deutlich niedriger und aktives TGF- β_1 konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Da wir kein aktives TGF- β_1 im Medium nachweisen konnten, interpretieren wir dies als Hinweis für eine kovalente Kopplung von TGF- β_1 . Die Abnahme der Konzentration an latentem TGF- β_1 deutet auf eine Adsorption des latenten TGF- β_1 aus dem Medium an der OT-Oberfläche oder einen Abbau des Proteins hin. Um die kovalente Kopplung zu beweisen, könnten sehr komplexe Methoden wie XPS

(Röntgenstrahl-Photoelektronen-Spektroskopie) oder IR (Infrarot)-Spektroskopie hilfreich sein, welche in unserem Labor nicht verfügbar sind und nur unter sehr hohem Aufwand zu betreiben sind.

Die Immobilisierung von TGF- β_1 wurde jeweils nur an einem kleinen Teil des OT durchgeführt. Der restliche unbeschichtete Teil diente als „On-Slide“-Kontrolle. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde die Differenzierungsrate auch in diesem Bereich ermittelt, um eine eventuelle Desorption des TGF- β_1 vom beschichteten Bereich und damit eine Auswirkung des Wachstumsfaktors auch auf die Zellen auf dem nicht beschichteten Bereich in der Kammer zu überprüfen. Es zeigte sich in unseren Versuchen eine signifikante Zunahme der MF-Differenzierungsrate auf den mit TGF- β_1 beschichteten Bereichen im Vergleich zu den unbeschichteten Bereichen. Bei 3-D-HTA-Aldehyd-OT wurde eine Steigerung von 6,4%, bei SuperAldehyd-OT von 9,4% und bei SuperEpoxy-OT von 5,4% erreicht. Prinzipiell ist immobilisiertes TGF- β_1 geeignet, die MF-Differenzierungsrate zu steigern.

Die Zunahme war auf den SuperAldehyd-OT höher im Vergleich zu 3-D-HTA-Aldehyd-OT, obwohl eine gleiche Kopplungschemie angewendet worden war.

Eventuell könnten andere Faktoren, die einen Einfluss auf die MF-Differenzierung haben, ursächlich dafür sein, zum Beispiel unterschiedliche Oberflächenmerkmale verschiedener Materialien: Die SuperAldehyd-OT bestehen aus Glas, wohingegen die 3-D-HTA-Aldehyd-OT aus polymerisiertem Cycloolephin hergestellt werden. Die Differenzierungsrate auf den unbeschichteten Bereichen der 3-D-HTA-Aldehyd-OT lag unter denen der Glaskontrollen. Es ist bekannt, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften zum Beispiel die Hydrophobie einer Oberfläche Einfluss auf das Proteinadsorptionsmuster haben. Somit könnten die unterschiedlichen Materialien der OT verantwortlich für die unterschiedlichen basalen Differenzierungsraten sein.

Die Adsorption von Fibronektin und anderen Proteinen der ECM ist von besonderem Interesse, weil ihre Verteilung auf einer Oberfläche das Anhaften von Fibroblasten beeinflusst (Fauxcheux N. et al 2004). Unterschiedliche Adsorption von ECM-Proteinen an Glas-OT und Cycloolephin-OT könnte somit einen Einfluss auf das Anhaften der Fibroblasten haben und dadurch die Differenzierungsrate beeinflussen. Im Fall der SuperEpoxy-OT zeigten die normale Glaskontrolle und das beschichtete Areal ähnliche Ergebnisse, aber das unbeschichtete Areal der on-slide-Kontrolle zeigte eine deutlich niedrigere MF-Differenzierungsrate. Auch hier spielen

wahrscheinlich eher primäre Oberflächeneigenschaften eine Rolle, als der Einfluss vom immobilisierten Wachstumsfaktor.

Das Beschichten der aminosilanisierten OT mittels GDA führte zu einer erhöhten Differenzierungsrate des beschichteten Areals im Vergleich zum unbeschichteten Areal. Die MF-Differenzierungsrate auf den unbeschichteten Arealen der aminosilanisierten OT waren im Vergleich zur normalen Glaskontrolle reduziert, vielleicht ebenfalls wegen Unterschieden in den Oberflächeneigenschaften.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Immobilisierung von TGF- β_1 an Aldehyd- und Epoxid-funktionalisierten OT den größten Erfolg bei der Induktion der MF-Differenzierung brachte. Aminosilanisierte OT waren möglicherweise wegen einer ungenügenden Dichte der reaktiven Gruppen nicht geeignet für unsere Immobilisierung.

Insgesamt sollte in Zukunft dem Einfluss von physikalisch-chemischen Eigenschaften der OT-Oberflächen (z.B. Hydrophobie) und der daraus resultierenden Proteinadsorption, die das Wachstum der Zellen beeinflusst, mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Ausblick

Die Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen wurde schon oft als Ansatz für Tissue Engineering verwendet. Ein praktisches Ziel ist es, zum Beispiel durch funktionalisierte proteinbeschichtete Oberflächen die Biokompatibilität und das Einwachsen medizinischer Implantate zu verbessern (Park YJ. et al 2006, Müller R. et al 2005, Schleicher I. et al 2005). Die Integrin-Bindungs-Sequenz RGD, Kollagen, bone morphogenetic protein-2, und Vitronectin sind Beispiele für Biomoleküle, die schon an unterschiedliche Oberflächen gebunden wurden (Kroese-Deutman HC. et al. 2005, Schleicher I. et al. 2005, Schliephake H. et al. 2005, Morra M. et al. 2003).

Gerüste im Tissue Engineering können in drei Gruppen unterteilt werden: natürlich abgeleitete Materialien (z.B. Kollagen), nichtzelluläre Gewebematrices (z.B. Blasen-submucosa, Dünndarm-submucosa) und synthetische Polymere (z.B. Poly-Glykolsäure, Poly-Milchsäure).

Ein ideales Biomaterial muss den mechanischen und physikalischen Anforderungen entsprechen, eine dreidimensionale Kultur von Zellen ermöglichen, es muss biokompatibel sein und biologisch abbaubar sein. Für einige Applikationen ist es

notwendig, dass das Gerüst die Haftfähigkeit, Vermehrung, Wanderung und Differenzierung der Zellen reguliert.

Einige dieser Eigenschaften konnten mit der Applikation von Wachstumsfaktoren oder Peptiden auf Gerüsten ermöglicht werden, indem man diese mit Aminosäuren polymerisierte (Kim BS. et al 2000).

Die kovalente Bindung von Wachstumsfaktoren an Oberflächen soll uns ermöglichen, Implantate mit einem oder mehreren Wachstumsfaktoren zu beschichten. Im Vergleich zur einfachen Adsorption soll damit die Desorption minimiert und die Stabilität der Wachstumsfaktoren erhöht werden. Sogar die Produktion von verschiedenen Mustern oder Konzentrationsgradienten könnte realisiert werden.

Der Beweis, dass das methodische Prinzip funktioniert, wurde in dieser Arbeit am Fibroblasten/MF-System erbracht. Diese Methoden können auf andere Zellsysteme übertragen werden, welche ein höheres Differenzierungspotential besitzen wie beispielsweise menschliche Stammzellen. Mögliche Ziele in einer naheliegenden Zukunft sind die Induktion der Differenzierung adulter menschlicher Stammzellen in die osteogene, adipöse und chondrogene Zelllinie.

6.1. Abkürzungen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen werden in der folgenden Tabelle definiert.

α -SMA	α -smooth-muscle actin
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATPS	3-Aminopropyltriethoxysilan-Lösung
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovine serum albumin
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenyl-di-hydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxide
ECM	extrazelluläre Zellmatrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetate
GDA	Glutardialdehyd
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HCl	Chlorwasserstoff
IBMT	Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik
IGF II	insulin like growth factor II
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
LAP	latency associated peptide
LSAB	labeled streptavidin biotin
LTBP	latent TGF- β binding protein
MF	Myofibroblast
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NHDF	normale humane dermale Fibroblasten
OT	Objektträger
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PLGA	poly lactic-co-glycolic acid
PP	Phosphatpuffer
Q333	Quantum 333
RGD	Integrin-Bindungs-Sequenz
RT	Raumtemperatur
SARA	smad anchor for receptor activation
SMAD	similar to mothers against decapentaplegic
t	Zeit
T	Temperatur
TGF- α	transforming growth factor α
TGF- β_1	transforming growth factor β_1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polysorbat 20
U	Umdrehungen
VEGF	vascular endothelial growth factor

6.2. Lösungen**Phosphatpuffer 0,05 M:**

Kaliumdihydrogenphosphat	6,8 g
Aqua dest. ad	1 l
mit NaOH (1 M) titrieren auf pH 11	

Waschpuffer:

Kaliumdihydrogenphosphat (0,05 M)	5,44 g
NaCl (0,154 M)	7,2 g
Aqua dest. ad	800 ml
mit NaOH (0,2 M) titrieren auf pH 7,5	
Tween 20	0,1%

TGF- β_1 -Stammlösung c = 50 $\mu\text{g/ml}$:

TGF β_1	5 μg
Aqua dest. ad	100 μl

Ascorbinsäurelösung 5 mM:

Ascorbinsäure	44 mg
PBS ad	50 ml

Piranha-Lösung: H_2SO_4 (96%) : H_2O_2 (30%), 2 : 1**Tris-Puffer:**

Tris (0,05 M)	4,85 g
NaCl (0,154 M)	7,2 g
Aqua dest. ad	800 ml
mit HCl (0,2 M) titrieren bis pH 7,6	

DAB-Arbeitslösung (LSAB-Kit):

Puffer	500 μl
DAB-Lösung	10 μl

PBS

PBS	4 Tabletten
Aqua dest ad	400 ml

6.3. Literaturverzeichnis

Adler K, Craighead J, Vallyathan N, Evans J (1981) Actin-containing cell in human pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology* 102: 427-437

Agrawal CM and Ray RB (2001) Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 55: 141-150

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim: 569-584

Badid C, Mounier N, Costa AMA, Desmoulière A (2000) Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: Interest of their assessment in nephropathies. *Histology and Histopathology* 15: 269-280

Baur P and Parks D (1983) The myofibroblast anchoring strand: The fibronectin connection in wound healing and the possible loci of collagen fibril assembly. *The Journal of Trauma* 23: 853-862

Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. (2005) Radiation and the microenvironment—tumorigenesis and therapy. *Nature Reviews Cancer* 5:867–75.

Bhathal PS (1972) Presence of modified fibroblasts in cirrhotic livers in man. *Pathology* 4: 139-144

Border WA and Noble NA (1994) Mechanisms of disease: Transforming growth factor (Beta) in tissue fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 331: 1286-1292

Brown EJ (1995) *Phagocytosis*. *Bioessays* 17: 109-117

Brunner G and Blakytyn R (2004) Extracellular regulation of TGF- β activity in wound repair: Growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Thrombosis and Haemostasis* 92: 253-261

Chalfoun CT, Wirth GA, Evans GRD (2006) Tissue engineered nerve constructs: Where do we stand? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10: 209-317

Chin GA, Diegelmann RF, Schultz GS (2005) Cellular and molecular regulation of wound healing. *Wound Healing* 2005: 17-39

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G (1993) Transforming growth factor- β_1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 122: 103-111

Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *American Journal of Pathology* 146: 56-66

De Wever O, Demetter P, Mareel M and Bracke M (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *International Journal of Cancer* 123: 2229–2238

Diegelmann RF and Evans MC (2004) Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience* 9: 283-289

Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU, Homann HH (2004) Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research* 68A: 10-18

Ducheyne P and Qiu Q (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20: 2287-2303

Eickelberg O, Pansky A, Koehler E, Bihl M, Tamm M, Hildebrand P, Perruchoud AP, Kashgarian M, Roth M (2001) Molecular mechanisms of TGF-beta antagonism by interferon-gamma and cyclosporine A in lung fibroblasts. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15: 797-806

Elisseeff J, Puleo C, Yang F, Sharma B (2005) Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthodontics & Craniofacial Research* 8: 150-161

El-Sakka AI, Hassoba HW, Pillarisetty RJ, Dahiva R, Lue TF (1997) Peyronie's disease is associated with an increase in transforming growth factor-beta protein expression. *The Journal of Urology* 158: 1391-1394

Epstein FH, Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000) Role of Transforming Growth Factor beta in human disease. *The New England Journal of Medicine* 342: 1350-1358

Ewers R, Turhani D, Item CB, Kapral D, Thurnher D, Cvikl B, Weissenböck M, Erovic BM, Lauer G (2003) Bioengineered Knochen-Produktion -Aktuelle Anwendungen des Tissue Engineering in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* 19: 153-158

Faucheux N, Schweiss R, Lützwow K, Werner C, Groth T (2004) Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* 25: 2721-2730

Fischer U, Hempel U, Becker D, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW (2003) Transforming growth factor beta1 immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity. *Biomaterials* 24: 2631-2641

Flanders KC and Burmester JK (2002) Medical applications of transforming growth factor- β . *Clinical Medicine & Research* 1: 13-20

Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, Gibson LJ (2001) Fibroblast contraction of a collagen GAG-matrix. *Biomaterials* 22: 2883-2891

Gabbiani G, Chaponnier C, Huttner I (1978) Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *The Journal of Cell Biology* 76: 561-568

Gabbiani G and Majno G (1972) Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *American Journal of Pathology* 66: 131-146

Gabbiani G, Ryan GB, Majno G (1971) Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27: 549-550

Gray AJ, Bishop JE, Reeves JT, Laurent GJ (1993) A α and B β chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *Journal of Cell Science* 104: 409-413

Gross, WO (1968) Die Optimalbedingungen zur Gefrierkonservierung mit Dimethylsulfoxid. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 23: 512-519

Harris AK, Stopak D, Wild P (1981) Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 290: 249-251

Heldin CH and Westermark B (1996) Role of platelet derived growth factor in vivo. In: Clark RAF (ed) *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. Plenum Press, New York, 249-273

Herman IM (1993) Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology* 5: 48-55

Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, Chaponnier C, Meister JJ (2004) Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Molecular Biology of the Cell* 15: 4310-4320

Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C. E., Chaponnier, C. & Gabbiani, G. (2001) Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *American Journal of Pathology* 159: 1009-1020.

Holland TA, Bodde EW, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, Jansen JA (2005) Osteochondral repair in the rabbit model utilizing bilayered degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* 75A: 156-167

Horch RE (2006) Future perspectives in tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10: 4-6

Hunt TK (1980) (ed) Wound healing and wound infection: *Theory and surgical practice*. Appleton-Century-Crofts, New York: 264-280

Jennissen HP (2002) Accelerated and improved osteointegration of implants biocoated with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). *Annals of the New York Academy of Sciences*; 961: 139-42

Kim, BS, Baez, CE, Atala, A (2000) Biomaterials for tissue engineering. *World Journal of Urology* 18: 2-9

Kopp J, Jeschke MG, Bach AD, Kneser U, Horch RE (2004) Applied tissue engineering in the closure of severe burns and chronic wounds using cultured human autologous keratinocytes in a natural fibrin matrix. *Cell and Tissue banking* 5: 89-96

Kroese-Deutman HC, Van Den Dolder J, Spauwen PH, Jansen JA (2005) Influence of RGD-Loaded Titanium Implants on Bone Formation in Vivo. *Tissue Engineering* 11: 1867-1875

Leask A and Abraham DJ (2004) TGF- β signaling and the fibrotic response. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 816-827

Lee YS and Mrksich M (2000) Protein chips: from concept to practice. *Trends in Biotechnology* 20: 14-18

Lutz M and Knaus P (2002) Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signaling network. *Cellular Signalling* 14: 977-988

Mann BK, Schmedlen RH, West JL (2001) Tethered-TGF- β increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 22: 439-444

Marijnissen WJ, Van Osch GJ, Aigner J, Van Der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA (2002) Alginate as a chondrocyte delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 23: 1511-1517

Martin P (1997) Wound healing-Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75-81

Massagué J (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1: 169-178

Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R (2005) Tissue engineering of bone: Search for a better scaffold. *Orthodontics & Craniofacial Research* 8: 277-284

Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S (1996) Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 4219-4223

Moulin V, Castilloux G, Auger FA, Garrel D, O'Connor - McCourt, MD, Germain L (1998) Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts. *Experimental Cell Research* 238: 283-293

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Cahalan P, Cahalan L, Fini M, Giardino R (2003) Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 24: 4639-4554

Müller R, Abke J, Schnell E, Macionczyk F, Gbureck U, Mehrl R, Ruszczak Z, Kujat R, Englert C, Nerlich M, Angele P (2005) Surface engineering of stainless steel materials by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility. *Biomaterials* 26: 6962-6972

Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazziere R, Nunes I, Rifkin DB (1997) Latent transforming growth factor-beta: Structural features and mechanisms of activation. *Kidney International* 51: 1376-1382

Nagle RB, Kneiser MR, Bulger RE, Benditt EP (1973) Induction of smooth muscle characteristics in renal interstitial fibroblasts during obstructive nephropathy. *Laboratory Investigation* 29: 422-427

Oyama F, Murata Y, Saganuma N, Kimura T, Titani K, Sekiguchi K (1989) Patterns of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in human adult and fetal tissues. *Biochemistry* 28: 1428-1434

Park YJ, Kim KH, Lee JY, Ku Y, Lee SJ, Min BM, Chung CP (2006) Immobilization of bone morphogenetic protein-2 on a nanofibrous chitosan membrane for enhanced guided bone regeneration. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 43: 17-24

Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z (1988) Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: Analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241: 708-712

Ratner BD and Hoffman AS (2004) Physicochemical Surface Modification of Materials Used in Medicine. Subtitle: Methods for modifying the surface of materials. In: *Biomaterials Science*, Elsevier Academic Press, San Diego: 204-207

Roberts AB and Sporn MB (1996) Transforming growth factor- β . In: Clark RAF (ed) The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd ed., Plenum Press, New York: 275-308

Ronnov-Jessen L and Petersen OW (1993) Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Laboratory Investigation* 68: 696-707

Sato Y, Okada F, Abe M, Seguchi T, Kuwano M, Sato S, Furuya A, Hanai N, Tamaoki T (1993) The mechanism for the activation of latent TGF- β during co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells: Cell-type specific targeting of latent TGF- β to smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology* 123: 1249-1254

Schleicher I, Parker A, Leavesley D, Crawford R, Upton Z, Xiao Y (2005) Surface Modification by Complexes of Vitronectin and Growth Factors for Serum-free Culture of Human Osteoblasts. *Tissue Engineering* 11(11/12): 1688-1698

Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaum S, Roessler S, Sewing A (2005) Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on periimplant bone formation. *Clinical Oral Implants Research* 16: 563-569

Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G (1997) Myofibroblast; in: Sternberg SS (ed) *Histology for Pathologists*. Raven Press Ltd, New York, 2nd ed: 129-165

Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G (1998) The myofibroblast: A quarter century after its discovery. *The American Journal of Surgical Pathology* 22: 141-147

Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Tremblay G (1979) Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma: a possible host response to neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology* 3: 525-533

Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G (1998) The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1. *The Journal of Cell Biology* 142: 873-881

Serini G and Gabbiani G (1999) Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation. *Experimental Cell Research* 250: 273-283

Simmons JG, Pucilowski JB, Lund PK (1999) Autocrine and paracrine action of intestinal fibroblast-derived insulin-like growth factors. *American Journal of Physiology* 276 (*Gastrointestinal and Liver Physiology* 39): G817-827

Singer A, Clark RAF (1999) Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine* 341: 738-746

Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L (1989) Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *Journal of Histochemistry Cytochemistry* 37: 315-321

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G (1986) A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *The Journal of Cell Biology* 103: 2787-2796

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Molecular and Cellular Biology* 22: 349-363

Tomasek JJ, Vaughan MB, Haaksma CJ (1999) Cellular structure and biology of Dupuytren's disease. *Hand Clinics* 15: 21-34

Vacanti CA (2006) History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Engineering* 12: 1137-1142

Vandekerckhove J and Weber K (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the aminoterminal tryptic peptide. *Journal of Molecular Biology* 126: 783-802

Vandekerckhove J and Weber K (1978) Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 75: 1106-1110

Vehof JW, Haus MTU, de Ruijter AE, Spauwen PHM, Jansen JA (2002) Bone formation in transforming growth factor beta-I-loaded titanium fiber mesh implants. *Clinical Oral Implants Research* 13: 94-102.

Weetall HH (1976) Covalent coupling methods for inorganic support materials. *Methods in Enzymology*; 44: 134-148

Werner, S. and Grose R. (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews* 83: 835-70

Werz, O., Brungs, M., and Steinhilber, D (1996) Purification of transforming growth factor beta1 from human platelets. *Die Pharmazie* 51: 893-896

Xu J and Clark RAF (1996) Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *The Journal of Cell Biology* 132: 239-249

Xu L and Massagué J (2004) Nucleocytoplasmic Shuttling of Signal Transducers. *Nature reviews. Molecular and Cellular Biology* 5: 1-10

Yang L, Qiu CX, Ludlow A, Ferguson MWJ, Brunner G (1999) Active transforming growth factor- β in wound repair: Determination using a new assay. *American Journal of Pathology* 154: 105-111

6.4. Publikationen

Artikel

1. Metzger W, Grenner N, Motsch SE, Strehlow R, Pohlemann T, Oberringer M: Induction of myofibroblastic differentiation in vitro by covalently immobilized transforming growth factor- β_1 . Tissue Eng 13(11): 2751-2760 (2007)

Veröffentlichte Tagungsbeiträge

Vorträge:

1. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 92. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie und 47. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie, 02. - 06.10.2006, Berlin: Metzger W, Grenner N, Pohlemann T, Oberringer M: Induktion der Differenzierung von normalen humanen dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten durch immobilisierten Transforming Growth Factor beta 1. German Medical Science (2006)

2. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 93. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie und 48. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie und Unfallchirurgie, 24. - 27.10.2007, Berlin: Metzger W, Grenner N, Strehlow R, Pohlemann T, Oberringer M: Immobilisierter Transforming Growth Factor beta 1 induziert die Differenzierung von normalen humanen dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten. German medical science e-journal: www.egms.de/en/meetings/dkou2007/07dkou008.shtml

Posterpräsentationen:

1. 2. Internationale Konferenz "Strategies in Tissue Engineering", 31.05. - 02.06.2006, Würzburg: Metzger W, Grenner N, Pohlemann T, Oberringer M: Induction of differentiation from normal human dermal fibroblasts to myofibroblasts by immobilized transforming growth factor beta 1. Cytotherapy 8 (Supplement 2): 54 (2006)

2. 11. Chirurgische Forschungstage, 15. - 17.11.2007, Saarbrücken: Metzger W, Grenner N, Strehlow R, Pohlemann T, Oberringer M: Immobilized transforming growth factor beta 1 induces myofibroblastic differentiation of normal human dermal fibroblasts. Langenbecks Arch Surg 392: 825 (2007)

3. 2nd International Symposium on Biotechnology in Musculoskeletal Repair, 02. - 04.10.2008, Lausanne, Schweiz: Metzger W, Grenner N, Strehlow N, Pohlemann T, Oberringer M: Normal human dermal fibroblasts differentiate into contractile myofibroblasts after contact with bioactive surfaces. European Cells and Materials 16(4): 57 (2008)

6.5. Lebenslauf

Name: Murawski, Nadine Simone

Geburtsname: Grenner

Geburtsdatum: 12. Oktober 1980

Geburtsort: Ottweiler

Nationalität: Deutsch

Familienstand: Verheiratet

Schulen: 1987 bis 1991: Grundschule, Waldmohr
1991 bis 1993: Gymnasium Wendalinum, St.Wendel
1993 bis 2000: Gymnasium Johanneum, Homburg
2000: Abitur (Note: 2,0)

Hochschulausbildung: WS 2000 bis SS 2002: Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes
WS 2002 bis WS 2008: Humanmedizin, Universität des Saarlandes

Ärztliche Vorprüfung: August 2004 (Note: 2,66)

Famulaturen: 2005: Anästhesie, St. Johanniskrankenhaus, Landstuhl
2006: Unfallchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
2006: Urologie, Praxis Dr. Jeanelle, Neunkirchen
2007: Gynäkologie, Klinikum Saarbrücken

Praktisches Jahr: 8/2007 - 12/2007: 1. Tertial: Anästhesie, Universitätsklinikum des Saarlandes
12/2007 - 3/2008: 2. Tertial: Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
3/2008 - 7/2008: 3. Tertial: Innere Medizin, Universitätsklinikum des Saarlandes

Ärztliche Prüfung: November 2008 (Note: 2,0)

Beruf: Seit 1/2009: Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universitätsklinikum des Saarlandes

6.6. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann, für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit in seinem Labor und die Bereitstellung der notwendigen Mittel.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern, Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Metzger und dem Leiter des molekularbiologischen Labors, Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Oberringer, für ihre fachliche und emotionale Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit, das extrem schnelle Korrekturlesen der vorgelegten Manuskripte und nicht zuletzt für ihr stetiges Antreiben und ihre unermüdliche Geduld mit mir.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei Frau Martina Jennewein, Frau Monika Bubel und Frau Sandra Motsch, die mir zu jeder Zeit hilfsbereit zur Seite standen.

Ein Dank an alle für die herzliche, fast familiäre Atmosphäre, die man als Doktorand in diesem Labor erfährt.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Mutter und meinem Mann Niels, die mich stets unterstützt und gefördert haben.